

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**IDENTIFICACIÓN E INCRIMINACIÓN DE POTENCIALES ESPECIES DE
VECTORES (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) DEL VIRUS LENGUA AZUL
(*ORBIVIRUS*) EN VENADO COLA BLANCA (*ODCOILEUS VIRGINIANUS*) Y
ESPECIES DE GANADO EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

POR

M. C. JORGE ALEJANDRO LOZANO RENDÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO DE VIDA SILVESTRE Y
DESARROLLO SUSTENTABLE**

NOVIEMBRE, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



IDENTIFICACIÓN E INCRIMINACIÓN DE POTENCIALES ESPECIES DE
VECTORES (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) DEL VIRUS LENGUA AZUL
(*ORBITRIVIRUS*) EN VENADO COLA BLANCA (*ODCOILEUS VIRGINIANUS*) Y
ESPECIES DE GANADO EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO.

POR

M. C. JORGE ALEJANDRO LOZANO RENDÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO DE VIDA SILVESTRE Y
DESARROLLO SUSTENTABLE

NOVIEMBRE, 2015

IDENTIFICACIÓN E INCRIMINACIÓN DE POTENCIALES ESPECIES DE
VECTORES (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) DEL VIRUS LENGUA AZUL
(*ORBIVIRUS*) EN VENADO COLA BLANCA (*ODCOILEUS VIRGINIANUS*) Y
ESPECIES DE GANADO EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO.

Comité de Tesis

Dr. Armando Jesús Contreras Balderas
Presidente

Dr. José Ma. Torres Ayala
Secretario

Dr. Ildelfonso Fernández Salas
Vocal

Dr. Juan Antonio García Salas
Vocal

Dr. Roberto Mercado Hernández
Vocal

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Virus lengua azul.....	3
2.2 La transmisión de la enfermedad.....	4
2.3 <i>Culicoides</i>	4
2.4 <i>Odocoileus virginianus</i> (Venado Cola Blanca).....	5
2.5 Presencia del Virus Lengua Azul en América.....	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo General.....	14

5.2 Objetivos Particulares.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Área de estudio y captura de insectos	15
6.2 Diseño experimental para la captura.....	15
6.3 Lugar de trabajo en el laboratorio.....	16
6.4 Identificación de especímenes.....	16
6.5 Detección molecular de <i>Orbivirus</i> (Lengua Azul).....	17
6.6 Detección serológica de VLA.....	18
6.7 Análisis Estadístico.....	19
7. RESULTADOS.....	20
8. DISCUSION.....	24
9. CONCLUSIONES.....	29
10. RECOMENDACIONES.....	30
11. LITERATURA CITADA.....	31
12. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	36

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Armando J. Contreras Balderas Director de mi tesis. Así como al Dr. Ildelfonso Fernández Salas y al Dr. Ramiro Avalos Ramírez (Director externo), Dr. José María Torres Ayala, Dr. Juan Antonio García Salas, Dr. Roberto Mercado Hernández por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Laboratorio de Entomología de la Facultad de Biología U.A.N.L. al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.A.N.L. y a la Administración de la Facultad de Medicina Veterinaria 2010-2016 a cargo del Dr. Juan José Zarate Ramos por todo el apoyo brindado.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me han brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme haber llegado a concluir este proyecto.

A mis padres Federico Lozano Galván (+) y Genoveva Rendón de Lozano (+) que siempre me inculcaron el estudio y la superación.

A mi Esposa (Adriana) mis dos Hijas (Adriana y Georgina) y a mi Hijo (Jorge) que son mi fuerza para seguir adelante.

A mis hermanos (a) Gabriela, Federico, Jaime y Cristóbal.

LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Áreas de estudio y cronograma de muestras.....	16
Tabla 2. Análisis insectos colectados por mes en relación de microrregión y meses del año 2013.....	21
Tabla 3. Análisis porcentos de sueros positivos por serología por microrregión y especies.....	22
Tabla 4. Relación de rumiantes muestreados para Lengua Azul con la prueba de ELISA en 2013.....	23
Tabla 5. Análisis de seroprevalencia por estación del año y especies.....	24
Tabla 6. Relación entre la detección molecular de los virus de BTV y EDHV en lotes de Culicoides y el sitio de captura en el Noreste de México....	25

LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINAS
Figura 1. Lugares de captura de <i>Culicoides</i> spp en <div style="padding-left: 40px;">microrregiones del Noreste de México.....</div>	16
Figura 2. Relación de insectos colectados por mes de 2013.....	21
Figura 3. Sueros positivos por serología.....	22
Figura 4. Seroprevalencia por estación.....	23
Figura 5. Temperatura optima de oligonucleótidos.....	24
Figura 6. Amplificación segmento 520pb del gen NS1.....	25
Figura 7. Detección Molecular del Virus de la Enfermedad Epizootica <div style="padding-left: 40px;">Hemorrágica del Venado (EEHV) en Órganos y Tejidos de <div style="padding-left: 40px;">Venado Cola Blanca Texano (<i>Odocoileus virginianus</i> <div style="padding-left: 40px;"><i>texanus</i>) en N. L.....</div> </div> </div>	25
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación <div style="padding-left: 40px;">del 266 pb de un fragmento del gen NS3/NS3A del BTV en <div style="padding-left: 40px;">lotes de <i>Culicoides</i>.....</div> </div>	27

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANP	Áreas naturales protegidas
ARN	Ácido ribonucleico
BT1	Biotipo 1
C	Centígrados
CO ₂	Dióxido de carbono
EEHV	Enfermedad epizoótica hemorrágica del venado
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
INIFAP	Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias
N	Norte
NL	Nuevo León
NS3	Proteína no estructural 3
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
S	Sur
SEMARNAT	Secretaría de medio ambiente y recursos naturales
UMA	Conservación de la vida silvestre
VLA	Virus lengua azul

RESUMEN

El identificar e incriminar las potenciales especies de vectores (Díptera: Ceratopogonidae) del Virus Lengua Azul (VLA, género *Orbivirus*, Familia Reoviridae) en el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y especies de ganado en el Estado de Nuevo León es de suma importancia para el manejo sanitario de rumiantes silvestres y domésticos. El área de estudio comprende cuatro microrregiones distintas del estado de Nuevo León. Para la captura de los posibles vectores (jejenes) se usaron trampas acondicionadas con emisión de luz ultravioleta y emisión de CO₂ a contraflujo. Las mismas se colocaron en sitios de los Municipios de Linares, General Bravo, Villaldama y Zaragoza. Los mosquitos se identificaron y clasificaron según sus características morfoanatómicas y se detectó molecularmente el VLA mediante RT-PCR. Se capturaron *Culicoides variipennis* en proporción variable según la época y la microrregión de estudio. Se encontraron moderados índices de seropositividad contra VLA en rumiantes silvestres y domésticos con asociación a la época del año. Incidentemente, se detectó un venado (*Odocoileus virginianus texanus*) afectado clínicamente por *Orbivirus*. *Culicoides variipennis* se encuentra en el estado de N.L. en cantidades variables según el área de estudio. Existe evidencia serológica del VLA en rumiantes silvestres y domésticos que está asociada a la especie animal.

ABSTRACT

Identifying and incriminate potential vector species (Diptera: Ceratopogonidae) of Bluetongue Virus (BTV, gender *Orbivirus* Family Reoviridae) in White-tailed Deer and different species of domestic livestock in the state of Nuevo León is very important for health management of wild and domestic ruminants. The study area comprises of four different micro state of Nuevo León. For capturing the gnats equipped with ultraviolet light emission and CO₂ emission counterflow traps were used. They were placed on different sites farms or in the municipalities of Linares, General Bravo, Villaldama and Zaragoza. Mosquitoes were identified and classified according to their morphoanatomical characteristics and the VLA was detected molecularly by RT-PCR. *Culicoides variipennis* were captured in varying proportions depending on the time and study the micro-region. Moderate rates of seropositivity against BTV were found in wild and domestic ruminants with an association to the time of year. Incidentally, a deer (*Odocoileus virginianus texanus*) affected by *Orbivirus* was detected clinically. The *Culicoides variipennis* circulate in the state of NL in varying amounts depending on the area of study. There is serological evidence of BTV in wild and domestic ruminant; it is associated with the animal species.

1. INTRODUCCIÓN

El VLA y el virus de la Enfermedad Epizootica Hemorrágica de los venados (EEDV) (Familia Reoviridae, Genero *Orbivirus*), son dos virus altamente emparentados y considerados como agentes infecciosos emergentes a nivel mundial. Ambos orbivirus son capaces de afectar a una variedad importante de rumiantes silvestres y domésticos. Debido a los efectos negativos sobre la economía de los sistemas pecuarios y entre otros, las dificultades para su control y erradicación, en los países miembros de la OIE, la aparición y circulación de estos orbivirus en rumiantes es de declaración obligatoria. Ambos virus se transmiten de forma primaria, entre los animales susceptibles, por especies de mosquitos del género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). El género *Culicoides* agrupa a los artrópodos hematófagos voladores más pequeños y abundantes, a nivel mundial se han reportado más de 1400 especies de las cuales más de 39 especies han sido implicadas como sospechosas o confirmadas como vectores biológicos del VLA y/o EEDV.

La identificación y diferenciación de las distintas especies de *Culicoides* puede llevarse a cabo mediante métodos fenológico (Sánchez *et al.* 2007) y moleculares. La capacidad o competencia de estos insectos vectores para transmitir a VLA y EEDV reside en su habilidad para aumentar la carga viral en el medio ambiente. Lo cual implica la habilidad de ambos virus para reconocer receptores de células intestinales del mosquito, la subsecuente internalización y replicación y diseminación a partir de este sitio hacia otros tejidos que permiten la dispersión como glándulas salivales y ovarios del insecto. La presencia de estos virus en los tejidos de sus insectos vectores es indicativa de la circulación y presencia en determinada región geográfica; por lo que la distribución de las enfermedades causadas por estos orbivirus dependen de la presencia y distribución en el medio ambiente estos insectos vectores. La epidemiología y aparición de brotes de las infecciones causadas por VLA y EEDV dependen de las múltiples interacciones que se establecen entre estos virus, sus vectores, el medio ambiente y la susceptibilidad del rumiante. En México, se ha reportado evidencia serológica y virológica del VLA en rumiantes domésticos. Particularmente, en el noreste de México, se han reportado altas

tasas de seropositividad contra VLA y EEDV en poblaciones de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*). De acuerdo a estos datos, aparentemente ocurren condiciones de medio ambiente favorables en esta zona del país para la presencia y circulación tanto del vector *Culicoides* como de los virus de la Lengua Azul y de la Enfermedad Epizootica hemorrágica del Venado. El presente estudio fue llevado a cabo para obtener parámetros entomológicos y de epidemiología molecular para poder determinar la presencia de secuencias genéticas de los *Orbivirus* VLA y EEDV en su vector potencial artrópodo *Culicoides* (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) capturado en microrregiones selectas del Noreste de México.

2. ANTECEDENTES

La Lengua azul es una enfermedad viral no contagiosa de rumiantes domésticos y silvestres transmitida por insectos hematófagos. Dada la importancia y los efectos de esta afección para la economía de la industria pecuaria mundial la enfermedad se ha incluido en la lista A de la Oficina Internacional de Epizootias (Metcalf *et al.*, 1980, OIE, 2002). El agente causal, el VLA, es el virus prototipo del genero *Orbivirus* dentro de la familia Reoviridae (Gould y Hyatt, 1994). El VLA tiene genoma de RNA doble cadena con 10 segmentos que codifican siete proteínas estructurales (VP1-VP7) y cuatro no estructurales (NS1, 2, 3, y 3A) (Mertens *et al.*, 1984; Gould y Hyatt, 1994).

Se han descrito cuando menos 24 serotipos a nivel mundial (Davies *et al.*, 1992; Huismans y Cloete, 1987). La infección por el VLA se presenta en regiones de clima templado y tropical en las cuales ocurre el vector, principalmente artrópodos hematófagos del genero *Culicoides*. En estas regiones la presentación de la enfermedad ocurre comúnmente a finales de verano cuando la densidad del vector aumenta, sin embargo la epidemiología y el curso de la infección depende de múltiples interacciones entre el virus, el vector y el animal (Gibbs y Greiner, 1994). La infección en la mayoría de los rumiantes es asintomática, destacándose los ovinos domésticos como la especie de mayor susceptibilidad (Gorman-B., 1990).

2.1 Virus Lengua Azul

La lengua azul es una enfermedad infecciosa no contagiosa, de etiología viral que afecta a los ovinos, caprinos, bovinos y a algunos rumiantes silvestres. Es transmitida principalmente por picaduras de insectos artrópodos hematófagos del género *Culicoides* y no afecta a humanos (Mellor, 1990).

La enfermedad se caracteriza por producir procesos febriles con inflamación catarral en las mucosas respiratorias y digestivas, inflamación en las bandas coronarias y láminas sensibles de las pezuñas, así como también degeneración muscular. En la hembra gestante produce placentitis, abortos y malformaciones congénitas. En el macho, infertilidad temporal con debilidad y emaciación que dan lugar a una convalecencia

prolongada y considerables pérdidas en la productividad. Los animales adultos que se recuperan de la infección generalmente desarrollan inmunidad únicamente a la cepa del virus responsable de la misma, y no son portadores del agente causal (Gorman, 1990).

2.2 La transmisión de la enfermedad

El agente causal de la lengua azul pertenece a la familia Reoviridae, del género *Orbivirus*, al que también pertenecen el virus de la enfermedad epizoótica hemorrágica de los venados y el virus ibaraki. Los *Orbivirus* tienen un genoma formado por diez segmentos de ARN de doble cadena para los que, hasta la fecha, se han identificado en el mundo 24 serotipos relacionados con la enfermedad (Gorman, 1990).

El virus de la lengua azul ha sido aislado de ovinos, bovinos, caprinos, venados de cola blanca y en otros rumiantes silvestres. En EE.UU. la transmisión se realiza por un único vector artrópodo (*Culicoides variipennis*) y en el Subtrópico y el Caribe por *C. insignes* y *C. pussilus*. Este último vector se extiende hasta la región de Brasil y Ecuador. El virus está presente en una franja de países que se extiende aproximadamente entre 40°N y 35°S. Se ha demostrado por serología la presencia del virus de la lengua azul en regiones en que está presente el vector *Culicoides* (por ejemplo, en África, EE.UU., América Central, América del Sur y algunos países de Asia y Oceanía). Sin embargo, sólo se ha observado en unos pocos países la enfermedad clínica con confirmación por aislamiento del virus, lo que indica que el problema puede ser mucho más extenso y que probablemente su aparición pueda estar relacionada con una disminución de la inmunidad de los animales (USAHA, 1998; Canals y Rosell, 2006).

El virus se ha encontrado en el semen de toros y carneros, y puede transmitirse a las vacas y ovejas susceptibles, pero este no es un mecanismo de transmisión significativo. El virus puede transferirse también al feto mediante la placenta. El virus no se transmite por contacto con animales o lana, ni por el consumo de leche. El virus de la lengua azul replica en células hematopoyéticas y de los vasos sanguíneos. La destrucción de estas células ocasiona las hemorragias e inflamaciones que generalmente se observan en el animal. (USAHA, 1998; Martín and Amken, 2000; Fenner *et al*, 1992). La lengua azul no es una zoonosis, por lo que no se transmite a humanos. Esto implica que los

productos elaborados con animales que posean el virus no tendrán ninguna repercusión para los consumidores, por lo que no se trata de un problema de sanidad animal (Mellor PS. 1990).

2.3 *Culicoides*

El vector biológico de la lengua azul es un díptero de la familia Ceratopogonidae, del género *Culicoides*, el cual se encuentra ampliamente distribuido a lo largo del mundo. En Europa, las principales especies relacionadas con la transmisión del virus de la lengua azul son *Culicoides imicola*, *Culicoides obsoletus* y *Culicoides pulicaris*. De ellas, *C. imicola* es la predominante y la responsable de los brotes de lengua azul ocurridos hasta la fecha, en España y Portugal (Mehlhorn *et al*, 2007). La presencia de los vectores va a condicionar la epidemiología de la enfermedad, tanto en su distribución geográfica como en la estacionalidad. En países templados, el período de actividad de *C. imicola* comprende desde los meses de Mayo-Junio hasta Noviembre-Diciembre, con el pico máxima abundancia entre Agosto y Octubre. Tal y como lleva ocurriendo en la cuenca del Mediterráneo durante los últimos años, estos períodos de máxima abundancia son los que dan lugar a la transmisión del virus de la lengua azul y a la aparición de brotes de la enfermedad que se puede extender fácil y rápidamente a todas aquellas áreas en las que coexisten vectores y vertebrados (Meiswinkel, *et al*, 2004).

Dentro de este género, las especie se clasifican en los subgéneros por diferentes criterios, por ejemplo, la pigmentación del patrón de las alas, por la longitud y por la forma de los segmentos de las antenas, en los machos por las características de los genitales y en las hembras por la distribución de la sensilia en las antenas, el número y el tamaño de la espermateca (Campbell y Pelham-Clinton 1960, Wirth y Huber1989; Boorman 1993; Rawlings 1996, Boorman y Hagan 2007). Sin embargo, de acuerdo a las investigaciones biológicas moleculares, algunos subgéneros son polifiléticos, que contiene tres o más complejos de especies (Meiswinkel *et al*. 2004).

Los *Culicoides* son insectos que se caracterizan por su pequeño tamaño pues miden entre 1.5 y 3 mm de longitud. Tienen las patas muy cortas y pliegan las alas sobre el dorso cuando se posan sobre la piel de los animales para picar. Poseen un pequeño

aparato bucal de tipo cortador chupador con el que hacen pequeños cortes en la piel donde se acumula la sangre que succionan con su trompa. Muy característico de éste género es la morfología de las alas que disponen de unas venas y celdillas características. También suelen tener manchas cuya forma y disposición son importantes para clasificarlos a nivel de especie (Mellor, 1990).

Como muchos dípteros sólo las hembras son hematófagas, necesitando ingerir sangre para que se produzca la maduración de los ovarios y el desarrollo de los huevos. Habitualmente son oportunistas y la gran mayoría suelen picar a cualquier tipo de animal incluso el hombre. La realidad es que dependiendo del lugar donde crían van a succionar sangre de las especies más abundantes. Los machos y también las hembras necesitan alimentarse de azúcares para sobrevivir y para mantener su actividad. Los azúcares los consiguen de plantas, de las flores y también directamente a los pulgones (Mehlhorn, *et al*, 2007).

Son insectos holometábolos es decir de metamorfosis compleja. Las hembras ponen huevos alargados fusiformes, con una longitud entre 200 y 500 micrones. De ellos salen unas larvas alargadas que tras sufrir tres mudas se transforman en pupas y éstas darán origen a los adultos. Los lugares donde realizan la puesta de huevos y se desarrollan las larvas varían mucho de una especie a otra. En general necesitan abundante materia orgánica que sirve de nutrientes a las bacterias, algas o nematodos de vida libre que son la base de su alimentación. Estos hábitats de cría varían mucho y pueden ser desde barros en zonas encharcadas, a agujeros de árboles con restos vegetales o incluso frutos en descomposición (Mellor, 1990).

Las especies que están implicadas en la transmisión de la Lengua Azul crían en zonas próximas a los lugares donde se encuentran los rumiantes y lo hacen en zonas con barros en praderas o cerca de abrevaderos o incluso las propias heces de los animales especialmente en las de ganado vacuno. El tiempo que tardan en desarrollar todo su ciclo varía con la especie y hábitat, pero sobre todo también con las temperaturas ambientales. Con temperaturas entre 28 y 35 °C el ciclo puede ser tan corto como unos 15 días pero

con temperaturas más bajas y sobre todo en invierno pueden invertir hasta siete meses en realizar todo su desarrollo larvario (Mehlhorn *et al*, 2007).

En general tienen actividad crepuscular y nocturna. Normalmente suelen empezar a volar cuando se pone el sol, aprovechando que disminuye la temperatura y aumenta la humedad ambiental. La sequedad del ambiente puede llegar a matarlos en pocas horas. Algunas especies que se han estudiado más detalladamente presentan su máxima abundancia justo en las primeras horas de actividad, más o menos hasta media noche, desapareciendo prácticamente durante la noche presentando un pequeño rebrote de actividad justo antes del amanecer. En días cubiertos y con humedad ambiente elevada pueden volar incluso durante el día (Balczun *et al*, 2009).

Hasta hace poco tiempo se pensaba que eran exófilos, es decir que pican a los animales solo en el medio ambiente, fuera de las construcciones o de zonas cubiertas. Recientemente se ha podido comprobar que llegan a penetrar dentro de las explotaciones ganaderas para alimentarse de los animales que se encuentran en su interior (Balczun, *et al*, 2009). En condiciones normales los adultos alados vuelan como mucho unos pocos centenares de metros. A pesar de ello parece que es habitual que se formen enjambres para realizar la cópula y que en determinadas condiciones de temperatura del suelo se forman corrientes ascendentes que pueden elevarlos decenas de metros sobre el mismo, si en ese momento se generan corrientes de aire con una velocidad de unos 10 metros por segundo, la temperatura que no sobrepase los 30 °C y una humedad superior al 25%, estas pueden llegar a transportar vivos a estos insectos centenares de kilómetros, desplazándolos de un país a otro o incluso de un continente a otro, colonizando nuevas zonas o portando virus en el caso de estar infectados (Mellor, 1990).

2.4 *Odocoileus virginianus* (Venado Cola Blanca)

En México podemos encontrar actualmente 4 especies de venados en vida silvestre: el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el venado bura (*Odocoileus hemionus*), el temazate rojo (*Mazama temama*) y el temazate gris yucateco (*Mazama pandora*) (Gallina y Mandujano, 2009). Como miembros de una misma familia, llamada Cervidae,

comparten similitudes físicas, tales como la presencia de astas, además de tener diferencias que los hacen distinguibles entre sí.

El venado cola blanca está ampliamente distribuido en nuestro país, con excepción de la Península de Baja California. También se localiza en el sur de Canadá, Estados Unidos de América y desde Centroamérica hasta Bolivia (Galindo-Leal y Weber, 1997; Gallina *et al.*, 2010). En México existen 14 subespecies o razas, las cuales habitan desde las selvas de Chiapas y Yucatán hasta los matorrales de Nuevo León. Generalmente las formas nortañas son de talla más grande y de coloración grisácea, y en los climas tropicales son más pequeños y de color rojizo (Mandujano *et al.*, 2010).

El venado ha tenido y tiene un papel importante en la economía de los pueblos indígenas y mestizos debido al consumo de su carne, al uso de sus pieles para elaborar prendas de vestir y artesanías, entre otras cosas. Ha sido utilizado en la caza furtiva y en la de subsistencia, actualmente la cacería deportiva se ha extendido a muchas regiones del país, produciendo importantes beneficios económicos. La industria de ésta es una actividad nueva, creciente y cada vez más importante, que genera empleos e ingresos económicos a quienes se dedican a ello (Gallina y Mandujano, 2009).

Desde una perspectiva biológica, los cérvidos son especies claves dentro de la naturaleza al formar parte de una red alimenticia como herbívoro dispersor de las semillas de las diversas plantas que come, y como presa de carnívoros: puma, coyote, gato montés y algunos otros (Fulbright y Ortega-S, 2007). Al morir, sus restos son consumidos por diversos animales carroñeros, como zopilotes y cuervos, y por varios pequeños y medianos carnívoros, como zorros y coyotes. Los excrementos de los venados son desintegrados, utilizados y reincorporados al suelo por muchos escarabajos y otros insectos. Las astas mudadas y los huesos son usados por roedores (ardillas y ratones) como una fuente de calcio (Galindo-Leal y Weber, 1997). En diversos sentidos, el venado tiene una gran importancia ecológica en los sitios donde vive, ésta se extiende a otros aspectos, como el económico, alimenticio y de supervivencia de las costumbres relacionadas con ellos en los pueblos indígenas.

Los venados llaman la atención de los cazadores por sus características físicas, éstos los utilizan como alimento, ropa o adorno, haciendo que las poblaciones de este animal se vean disminuidas severamente, lo anterior muchas veces provoca que las crías se queden sin protección. Las actividades que más perjudican a bosques y selvas, sitios donde habitan los venados, son la agricultura y la ganadería, ya que modifican el ambiente y dejan a sus habitantes sin comida ni lugar donde vivir, además se vuelve muy difícil que encuentren una pareja para reproducirse (Weber y González, 2003).

Las vacas y los chivos, entre otros, compiten por el alimento con los venados al ser introducidos a las zonas donde éstos habitan y también pueden contagiarlos de enfermedades que no son propias, por lo tanto es necesario hacer un buen manejo del ganado para que no perjudique a los venados (Villarreal-Espino, 2006). Para poder ayudar a conservar los venados se deben tomar acciones en contra de la cacería ilegal e informar a los cazadores y a la población acerca del correcto aprovechamiento que pueden hacer de ellos, por ejemplo, sobre la existencia de lugares donde pueden cazar de manera legal sin dañar gravemente a sus poblaciones, pues las leyes de nuestro país permiten su aprovechamiento siempre y cuando sea un sitio autorizado (Weber y González, 2003).

Además de las normas de protección, en México la conservación y el uso racional de las especies de fauna silvestre y por consiguiente de los venados están legalmente sustentados en 2 esquemas: las Áreas Naturales Protegidas (ANP) y las Unidades de Manejo para la Conservación y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) (SEMARNAT, 1997).

Las ANP son zonas terrestres o marinas destinadas a la protección de las especies que en ellas habitan. Dentro de una, los venados se encuentran protegidos, ya que no está permitida su caza. Sin embargo, éstos, así como otras especies de fauna y flora silvestre, representan una importante fuente de alimento en comunidades rurales, por lo que su consumo no debe ser totalmente prohibido, aunque sí regulado para un uso racional. En este sentido es donde entran las UMA, áreas definidas en las que es posible aprovechar

de manera racional una especie ya sea para consumo, para trofeo deportivo o para vender productos derivados de ésta (Fulbright, 2007).

Ambos esquemas resultan importantes para su conservación, siempre y cuando las personas encargadas de la protección (en el caso de las ANP) y de la planificación del uso racional (en las UMA) sean responsables y éticas (Mandujano y González-Zamora, 2009). Existen diversas formas a partir de las cuales se puede estimar su tamaño poblacional. Cuando es relativamente fácil observarlos, se pueden usar métodos en los que se cuentan directamente desde camionetas, helicópteros o avionetas; pero cuando es difícil ver uno, ya sea porque hay muy pocos o porque la vegetación es muy densa como en las selvas, se pueden llevar a cabo procedimientos indirectos donde, a partir de los rastros que dejan, como sus excrementos o huellas, se pueden contar.

2.5 Presencia del Virus Lengua Azul en América

En casi toda la zona de América hay presencia del virus lengua azul. En Norte América el principal vector ha sido durante mucho tiempo el *C. variipennis* (Mellor, 1990). Sin embargo, la evidencia actual sugiere que *C. variipennis* es, en realidad, un complejo de al menos tres subespecies definidas genéticamente (*C. c. occidentalis*, *C. v. sonorensis*, *C. v. variipennis*), de las cuales hay suficientes diferencias entre sí como para justificar su consideración como especies separadas (Tabachnick, 1992, Tabachnick *et al*, 1992). De estos, *C. v. sonorensis* se cree que es el principal vector de la lengua azul a partir de aislamientos de campo, existe una estrecha relación entre la distribución de los anticuerpos del VLA y la gama de *C. sonorensis* (Tabachnick, 1992, Tabachnick *et al*, 1992). Además, las poblaciones de *C. v. variipennis* han demostrado ser mucho más resistente que el *C. v. sonorensis*, en la infección oral por dicho virus (López *et al*, 1992, Tabachnick, 1996). Sobre la base de estos resultados se ha sugerido que las tasas bajas por vía oral de *C. v. variipennis* son un factor importante en la aparente ausencia de transmisión de la lengua azul en el noreste de Estados Unidos, una región donde *C. c. variipennis* es el único representante del complejo de especies, y se ha propuesto que estas áreas deben ser consideradas zonas libres de lengua azul (Tabachnick WJ, Holbrook FR. 1992). En el sureste de Estados Unidos el VLA puede ser co-transmitido

por *C. variipennis* y otras especies de *Culicoides*. En el centro-este de Alabama, una zona en donde la *C. variipennis* es escasa y donde *C. stellifer* es muy común, se registraron tasas de VLA mensual de seroconversión de hasta 87% en bovinos y en venados de cola blanca. También se han detectado productos de ARN del virus en *C. variipennis* y *C. Stellifer* (Mullen, Anderson, 1998). Más al sur, *C. variipennis* está ausente desde el sur de Florida, la región del Caribe, la mayor parte de América Central y toda América del Sur, sin embargo, estas son regiones donde también se han registrado casos del VLA. En estas zonas, *C. insignis* y *C. pusillus* se cree que son los principales vectores, y VLA 2, 3, y 6 han sido aislados de *C. insignis*, y VLA 3 y 4 de *C. pusillus* (Mo *et al*, 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

El Virus de la Lengua Azul (VLA) es causado por un *Orbivirus* de la familia Reoviridae. Afecta a ovejas, cabras, vacas, búfalos, camellos, antílopes y venados; las ovejas son más susceptibles. En varias partes del mundo el VLA es causa de pérdidas económicas considerables para el ganado. Las áreas con actividad del vector durante todo el año pueden mantenerse fácilmente por medio del ciclo continuo vector-huésped. El insecto se reproduce en el agua y abunda en las riberas de ríos, especialmente durante los períodos de lluvias. La infección en la mayoría de los rumiantes es asintomática y muy variable, destacándose los ovinos domésticos y la fauna silvestre como las especies de mayor susceptibilidad. Entre los síntomas más comunes se encuentra fiebre hasta 42°C que puede permanecer entre 2 y 11 días, hiperemia, tialismo, descarga nasal y ocular, lesiones necróticas en encías, mucosa bucal y lengua, hemorragias en mucosas, lesiones pódales y problemas reproductivos (abortos).

En la zona Noreste de México se ha reportado la actividad serológica del VLA en algunos rumiantes e incluso se ha aislado de bovinos y ovinos domésticos, no obstante, no se cuentan con datos actuales de la prevalencia de la infección y, además, no ha sido posible incluir otras especies de rumiantes mantenidos en el Estado. La enfermedad de Lengua Azul es una enfermedad que, desde el punto de vista de las autoridades oficiales del país, es de tipo exótica. Dados los efectos de esta enfermedad en las poblaciones de rumiantes silvestres y domésticas los datos del presente estudio servirán de base para que Médicos Veterinarios, Biólogos y otras profesiones afines establezcan medidas apropiadas de control, monitoreo y manejo de las especies involucradas y un mejor aprovechamiento de los recursos naturales.

4. HIPÓTESIS

Dadas las características ecológicas del noreste de México es probable que en esta región se presente distintas especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) que son portadores de secuencias genéticas del *Orbivirus*, mismos que están asociados a la seropositividad en rumiantes hospederos de distintas microrregiones de la región.

5. OBJETIVO GENERAL

Obtener parámetros entomológicos y de epidemiología molecular que permitan asociar la presencia de *Orbivirus* en su vector artrópodo (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) en Venado cola Blanca *Odocoileus virginianus* y ganado en el Noreste de México.

5.1 Objetivos específicos

1. Identificar a nivel fenotípico y molecular las distintas especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) que circulan en distintas regiones de Nuevo León.
2. Determinar la dinámica poblacional de las especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en dos periodos anuales consecutivos.
3. Detectar secuencias genéticas de *Orbivirus* en el vector potencial *Culicoides* spp. y asociar su presencia a la seropositividad en rumiantes silvestres y domésticos, hospederos en distintas microrregiones del Noreste de México.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio y captura de insectos

El área de estudio comprendió cuatro microrregiones distintas del estado de Nuevo León **Figura 1**. Para la captura de los jejenes se usaron trampas acondicionadas con emisión de luz ultravioleta y emisión de CO₂ a contraflujo (Liberty Plus®, American Biophysics Co., USA) mismas que se colocaron en ranchos o ejidos, según la disposición para cooperar, en los municipios de Linares, Villaldama, China, General Bravo y Zaragoza. Los sitios de captura serán seleccionados acorde a las diferencias que existan entre ellas como microrregiones y serán referenciadas geográficamente con Geo-Posicionador satelital (GPS) comercial. Se tomaron en cuenta los parámetros de altura sobre el nivel del mar, temperatura y humedad local promedio mensual, vegetación predominante y distancia de la fuente de agua más cercana, tipo y cantidad aproximada de rumiantes silvestres y domésticos en un radio de 10 kilómetros.

Figura 1. Posición relativa de los sitios de captura de *Culicoides* spp en microrregiones del Noreste de México: 1: General Bravo, 2: Zaragoza, 3: Villaldama y 4: Linares.



De cada área se registro la temperatura y humedad al momento del muestreo mediante el uso de un termo-higrómetro portátil (Trotec BC 15). Estos datos se contrastaron con los datos de las estaciones de monitoreo climático que tiene la SAGARPA ó el INIFAP que se encuentren más próximos al sitio de muestreo. Las trampas se colocaron a 1.5 m. arriba del suelo y operaron desde una hora antes de la salida del sol y hasta una hora después de la puesta del sol. Por la mañana siguiente los insectos fueron recolectados en contenedores ó bolsas de plástico con un algodón humedecido con agua. Se almacenaron en refrigeración y se transportaron al laboratorio bajo estas condiciones.

6.2 Cronograma de muestras

El periodo de estudio comprendió desde enero del 2012 hasta diciembre del 2013 y se analizo la población de *Culicodes* spp capturadas a intervalos regulares durante tres noches seguidas de una semana del mes; según la **Tabla 1**.

Tabla 1. Áreas de estudio y cronograma de muestras.

Localización (Municipio)	Semana			
	1	2	3	4
Linares	X			
Zaragoza		X		
Villaldama			X	
General Bravo				X

Se pudieron obtener un total de 6 capturas por estación dando un total de 24 capturas anuales en cada microrregión seleccionada. Para el análisis de datos la captura de tres noches consecutivas, según el calendario propuesto, se contabilizo como una captura. En caso de lluvia se recorrió la captura una noche más.

6.3 Lugar del trabajo del laboratorio

La identificación y actividades para el reconocimiento de distintas especies de *Culicoides* se realizaron en el departamento de Entomología Medica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. La detección y diferenciación molecular de *Orbivirus* (Virus de la Lengua Azul) se realizaron en el Laboratorio de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

6.4 Identificación de especímenes

En laboratorio se conto el total de especímenes por captura y se inició la identificación fenotípica y el sexado. Los ejemplares que correspondan a *Culicoides* spp fueron separados del resto de los insectos y se obtuvo la proporción de *Culicoides* atrapados con respecto a otras especies de insectos. La identificación será realizada según lo reportado por Boorman 1980, Rowling 1996 y Boorman y Hagan 2007, los cuales se basan en el patrón característico de manchas ó áreas oscuras y claras de las alas e incluyen otros caracteres como el patrón del lado dorsal del tórax (mesonotum), tamaño y forma del segmento de las antenas, posición relativa de los ojos, cantidad de espermatecas en hembras y la forma de los genitales en machos; entre otros. Se obtuvo la proporción de las especies de *Culicoides* (por cantidad y sexo) basados en estas características para obtener la especie predominante por captura, mes, estación y región. Las distintas especies de *Culicoides* se registraron y almacenaron fotográficamente y en la base de datos a través del programa de Microsoft Excell 2007. Una vez identificados los insectos, y de acuerdo a la densidad encontrada, la mitad de especímenes se preservó en etanol al 70% y la otra en congelación a -80°C

6.5 Detección molecular de *Orbivirus* (Lengua Azul)

Lotes de más de 30 especímenes de distintas especies y fueron analizadas para determinar la presencia de secuencias genéticas del Virus de la Lengua Azul (VLA) mediante RT-PCR anidado. Se obtuvo el RNA total de cada lote con la ayuda del estuche comercial “FastRNA® Pro Soil – Direct Kit” y del Fast Prep-24 (www.mpbio.com), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se calculó la concentración de RNA mediante el método tradicional de espectrofotometría a 260 nm con la ayuda de un espectrofotómetro y se ajustó a 1µg/µl para llevar a cabo la RT-PCR.

Las reacciones de la RT-PCR anidada fueron llevadas a cabo con la ayuda de los estuches comerciales “SuperScript™ III one Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity” y “AccuPrime™ SuperMix I” (www.invitrogen.com) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación de un fragmento genético del VLA se realizó con ligeras modificaciones acorde al protocolo descrito Aradaib *et al.*, 2003. Los oligonucleótidos a emplear fueron diseñados en base a regiones altamente conservadas dentro del gen NS3 y aparentemente amplificarían todos los serogrupos del VLA descritos a la fecha. Las secuencias de los oligonucleótidos es como sigue: BT1: 5'-GAT-TAC-GCA-AAT-GCC-ACG-AG-3', BT2: 5'-TAC-GAG-GAG-GAT-GTC-GAA-GG-3', BT3: 5'-TTC-CGA-AGA-GCT-GTT-GTA-CA-3', BT4: 5'-GGT-GTA-ATG-GAA-ATT-CAC-CT-3'. BT1 y BT4 amplifican un fragmento de 790 pb dentro del gen NS3 dentro del segmento 10 del VLA. BT2 y BT3 producen un fragmento de 520 pb dentro del fragmento generado por BT1 y BT4. Todas las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 50 µl por tubo. Los ciclos de amplificación térmica para la PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Maxygen, Unión City, Calif. USA) y consistieron en : 2 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 95°C 1 minuto, 55°C 30 seg y 72°C 45 seg y una incubación final de 72°C por 10 min. La evidencia de amplificación se realizó en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etilo, para lo cual se separaron 20 µl del producto de PCR bajo condiciones de electroforesis acorde al protocolo estándar. El tamaño del producto amplificado se comparó contra un marcador de peso molecular de 1Kb (Axygen). Cada gel se fotodocumentó con la ayuda de un equipo y programa

diseñado para el propósito. (MultiDoc-It™ Imaging System (www.uvp.com)). En cada corrida se incluyeron controles negativos y positivos de reacción. El control positivo de reacción de la RT-PCR será el RNA obtenido de un virus vacunal del VLA tipo 10 (Colorado Serum Company, Denver, USA.) y el control negativos consistieron en agua doble destilada estéril libre de RNAsas y DNAsas.

6.6 Detección serológica de VLA

Se obtuvieron muestras aleatorias de rumiantes domésticos y eventualmente silvestres que se encontraron dentro de un radio de 10 km al sitio de colocación de la trampa para insectos. Los animales se mantuvieron en aéreas cercadas o libres y se manejaron por contención física y/o química. De forma arbitraria solo fueron seleccionados de 25 animales por especie (bovinos, ovinos, caprinos, cérvidos) y por estación del año y a partir de ellos se establecieron los índices de seropositividad contra VLA. La determinación serológica se realizará usando un estuche comercial basado en basado en ELISA de competencia (VMRD, inc.). Se utilizó el protocolo y criterios recomendado por el fabricante a partir del uso del suero de cada una de las especies de rumiantes seleccionadas.

6.7 Análisis estadístico

Se determinó la asociación entre la presencia de determinada especie de *Culicoides* spp con las microrregión, altura sobre el nivel del mar, temperatura y humedad local promedio mensual, densidad poblacional de rumiantes y seropositividad contra el VLA en distintos rumiantes del área de captura. Similarmente se obtuvo el grado de asociación entre la época del año y densidad estimada de *Culicoides* por microrregión. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS 17 (IBM). Los índices de seroprevalencia contra VLA en las distintas especies de rumiantes se obtuvo mediante la fórmula $P = \frac{N^\circ \text{ de animales positivo}}{N^\circ \text{ de animales muestreados}} \times 100$ (Steel, *et al*, 1997). Se utilizaron intervalos de confianza de un 95%, un análisis de la varianza por ANOVA y una comparación de medias mediante Tukey. Para los análisis estadísticos, $p < 0.05$ fue considerado significativo.

7. RESULTADOS

En los cuatro municipios de Nuevo León se encontraron Ceratopogónidos. La identificación de los *Culicoides* se realizó mediante las claves de Borrór y de Delongs, 2011. Los *Culicoides* encontrados son de la especie *variipennis* (este es un complejo en donde se encuentra la especie *sonorensis*, reportada para México). Sin embargo podemos hacer la diferenciación morfológica por medio de taxonomía molecular. La cantidad de mosquitos capturados estuvo asociada con la temperatura promedio anual, altura y época del año en el sitio de captura ($p < 0.01$). Lotes de entre 3 y 15 mosquitos hembras fueron analizados para detectar secuencias genéticas de VLA (parte del gen NS3/NS3A del segmento 10) y EEHV (parte del gen NS1 del segmento 5) empleando oligonucleótidos reportados en estudios previos. Con excepción de la microrregión, localizada en el municipio de Zaragoza N. L. ($23^{\circ}57'10.24''N$, $99^{\circ}46'12.24''O$; 1454 msnm), en la cual solo fue posible capturar un jején, los grupos de mosquitos capturados en todos los sitios resultaron RT-PCR positivos al VLA y al EEHV. La mayor proporción de grupos de mosquitos positivos al RT-PCR fue en primavera y verano. La presencia de secuencias genéticas de VLA y EEHV en mosquitos *Culicoides* spp capturados pueden eventualmente asociarse a la aparición de brotes de enfermedades causadas por estos virus en rumiantes silvestres y domésticos del noreste de México. El manejo de estas poblaciones animales debe de tomar en cuenta la circulación de culícidos portadores de ambos virus por los que es necesario realizar subsecuentes estudios para confirmar la presencia del VLA y EEHV en poblaciones potencialmente susceptibles. Se capturó *Culicoides variipennis* y se realizó un análisis de la proporción variable según la época y la microrregión de estudio y podemos ver como para el mes de abril hay una mayor incidencia de *Culicoides* por la época del año (**Tabla 2, Figura 2**). Se encontraron moderados índices de seropositividad contra VLA en rumiantes silvestres y domésticos con asociación respecto a la época del año (**Tabla 3, Figura 3**). Incidentemente, se detectó un venado (*Odocoileus virginianus texanus*) afectado clínicamente por *Orbivirus*. Adicional se realizó una relación de seroprevalencia estacional con los porcentos de casos positivos (**Tabla 4, Figura 4**). También se

relacionó la detección molecular de los virus de VLA y EEHV en lotes de *Culicoides* y el sitio de captura en el Noreste de México (**Tabla 5**). Mediante RT-PCR en gradientes de temperatura se logró obtener la temperatura optima de unión de los oligonucleótidos B1 y B4 (50, 55 y 56°C) (**Figura 5**). Además por PCR anidado se ha logrado poner a punto las condiciones para amplificar un segmento de 520bp del gen NS1 con los oligonucleótidos B2 y B3 (**Figura 6**). Para el sexado de los *Culicoides* se utilizó un microscopio estereoscópico para realizar la diferenciación de machos y hembras. Luego se llevó a cabo la extracción del RNA total y posteriormente se realizó el RT-PCR y DNA anidado. En la detección Molecular del Virus de la Enfermedad Epizoótica Hemorrágica del Venado (EEHV) en órganos y tejidos de Venado Cola Blanca Texano (*Odocoileus virginianus texanus*) en N.L. con un caso positivo. Adicional se detectó molecularmente un caso del virus de la EEHV en órganos y tejidos de un Venado cola blanca texano (*Odocoileus virginianus texanus*) en Villaldama, N.L. (**Figura 7**).

Tabla 2. Relación de insectos colectados por mes de 2013. Se muestran los números de insectos colectados por los meses de 2013 en Zaragoza, Linares, General Bravo,

Insectos Colectados por Mes 2013									
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agost	Sept	Oct	EEM	Valor P
Linares	24	23	0	0	0	6	0	0.32	0.512
Bravo	80	12	27	27	131	8	1	0.026	0.271
Villaldama	30	5	5	5	4	2	1	0.45	0.639
Zaragoza	0	0	0	0	1	0	1	0.39	0.785

Figura 2. Análisis insectos colectados por mes en relación de microrregión y meses del año 2013.

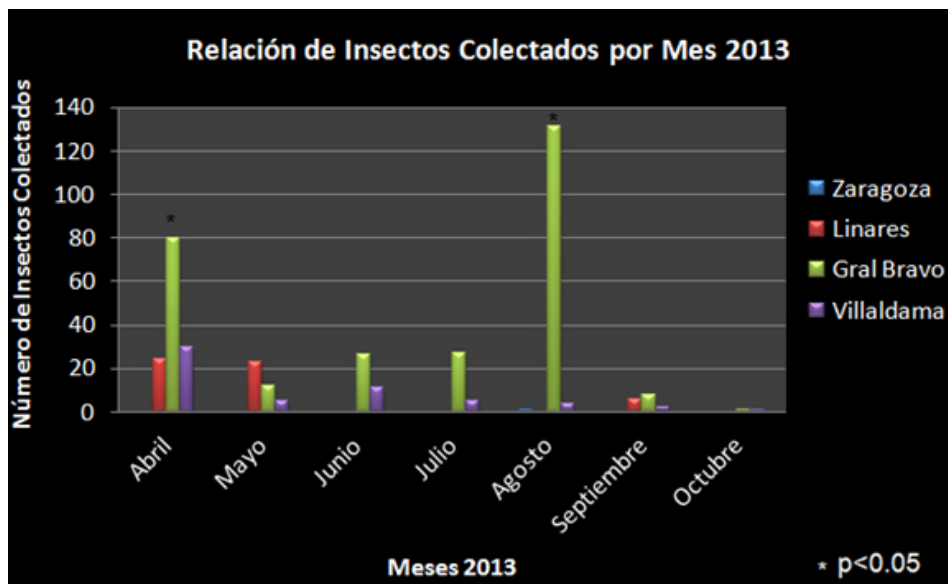


Tabla 3. Análisis porcentos de sueros positivos por serología por microrregión y especies.

Porcientos de Sueros Positivos por Serología						
	Venados	Bovinos	Ovinos	Caprinos	EEM	Valor P
Zaragoza	0	27	0	0	0.012	0.410
Linares	0	0	0	0	0	0
Bravo	0	39	0	38	0.023	0.311
Villaldama	43	0	0	0	0.019	0.298

Tabla 4. Relación de rumiantes muestreados para Lengua Azul con la prueba de ELISA en 2013

Municipio	Total de Sueros	Positivos	% Positivos	EEM	Valor P
Zaragoza	80	6	7.5	0.27	0.543
Villaldama	93	40	43.01	0.032	0.314
Linares	80	0	0	0	0
Gral. Bravo	134	50	37.31	0.019	0.223

Figura 3. Valores de los sueros positivos por serología. En el eje de y se presenta el porcentaje de sueros positivos y en el eje de x las especies muestreadas con relación a los Municipios muestreados. Se tomo como significativo a $p < 0.05$.

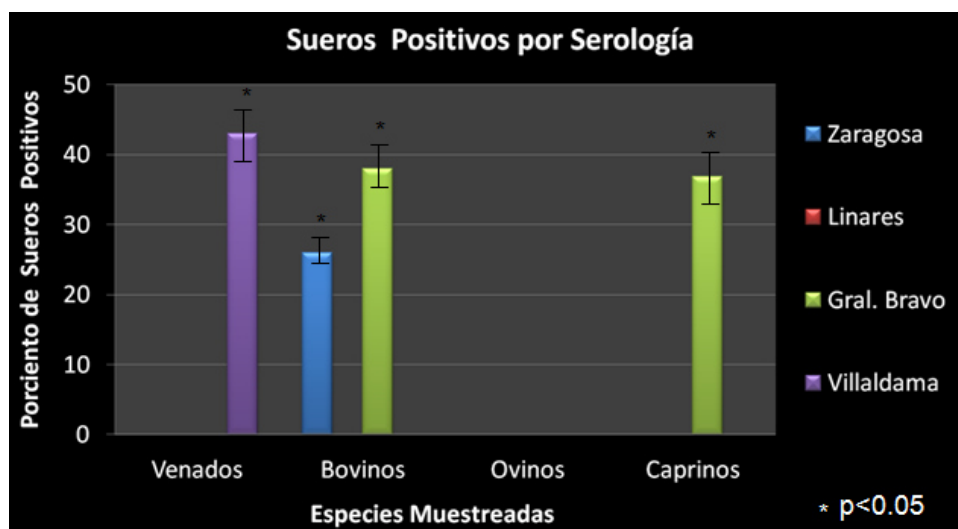


Tabla 5. Análisis de seroprevalencia por estación del año y especies.

Seroprevalencia por Estación del Año						
	Venados	Bovinos	Ovinos	Caprinos	EEM	Valor P
Primera (15-30°C)	26	53	9	33	0.037	0.245
Verano (18-38°C)	18	41	3	20	0.018	0.329

Figura 4. Seroprevalencia por estación. Las especies muestreadas durante el 2012-2013, venados, bovinos, ovinos y caprinos con sus respectivos porcentajes de casos positivos. Se consideran significativos $p < 0.05$.

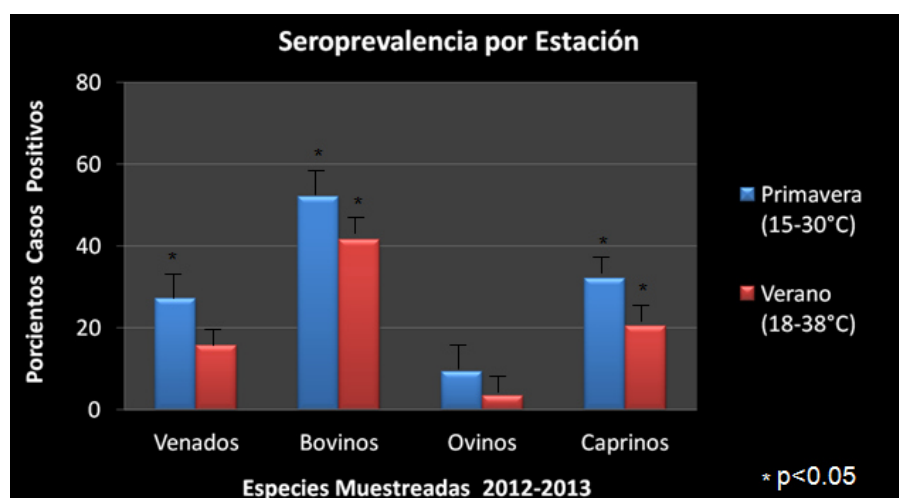


Tabla 6. Relación entre la detección molecular de los virus de VLA y EEHV en lotes de *Culicoides* y el sitio de captura en el Noreste de México.

Municipio	Posición ⁽¹⁾ Geográfica	Altura ⁽²⁾	Estación del año					
			Primavera (Marzo-Mayo)		Verano (Junio-Agosto)		Otoño (Septiembre- Noviembre)	
			VLA	EEHV	VLA	EEHV	VLA	EEHV
General Bravo	25°49'2.24"N, 99°15'31.47"O.	137	6/11 ⁽³⁾	4/11	8/15	4/15	0/2	0/2
Linares	24°51'13.69"N, 99°32'40.76"O.	345	3/8	0/8	1/3	0/3	0/2	0/2
Villaldama	26°29'04.06"N, 100°26'10.32"O.	434	3/5	2/5	1/3	2/3	0/1	0/1
Zaragoza	23°57'10.24"N, 99°46'12.24"O.	1454	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0	0/0

⁽¹⁾ Sitio de captura de los *Culicoides*, ⁽²⁾ altura sobre el nivel del mar, ⁽³⁾ Lotes + / N° total de lotes analizados.

Figura 5. Temperatura óptima de oligonucleótidos. Mediante RT-PCR en gradientes de temperatura se logró obtener la temperatura óptima de unión de los oligonucleótidos B1 y B4 (50, 55 y 56°C).

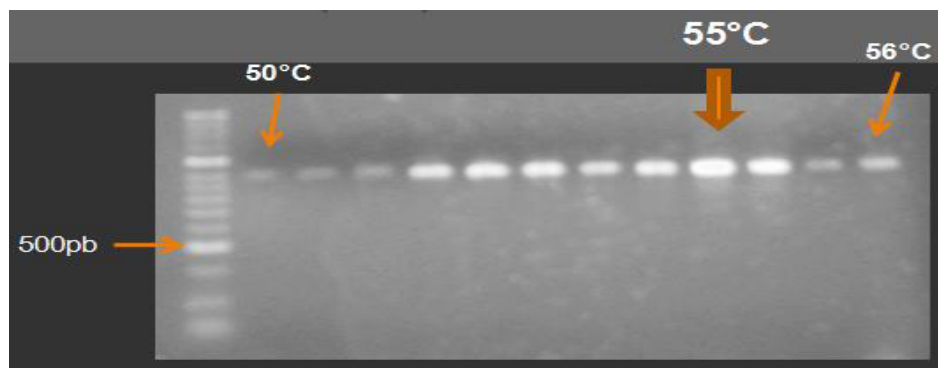


Figura 6. Amplificación segmento 520pb del gen NS1. Por PCR anidado se ha logrado poner a punto las condiciones para amplificar un segmento de 520bp del gen NS1 con los oligo-nucléotidos B2 y B3.

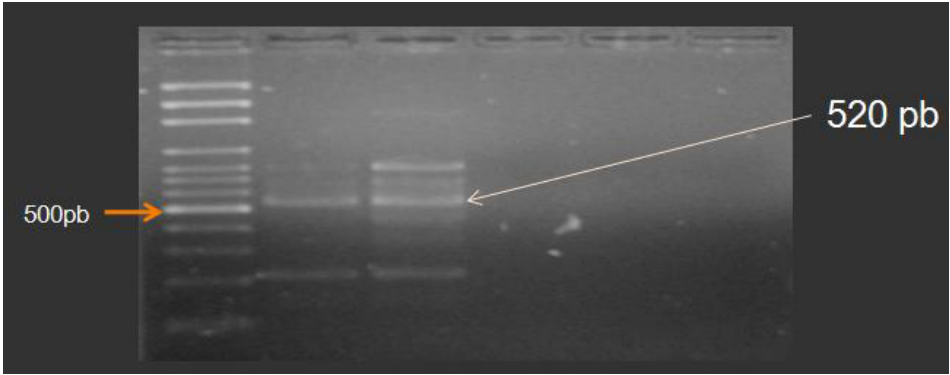


Figura 7. Detección Molecular del Virus de la Enfermedad Epizootica Hemorrágica del Venado (EEHV) en Órganos y Tejidos de Venado Cola Blanca Texano (*Odocoileus virginianus texanus*) en N. L.

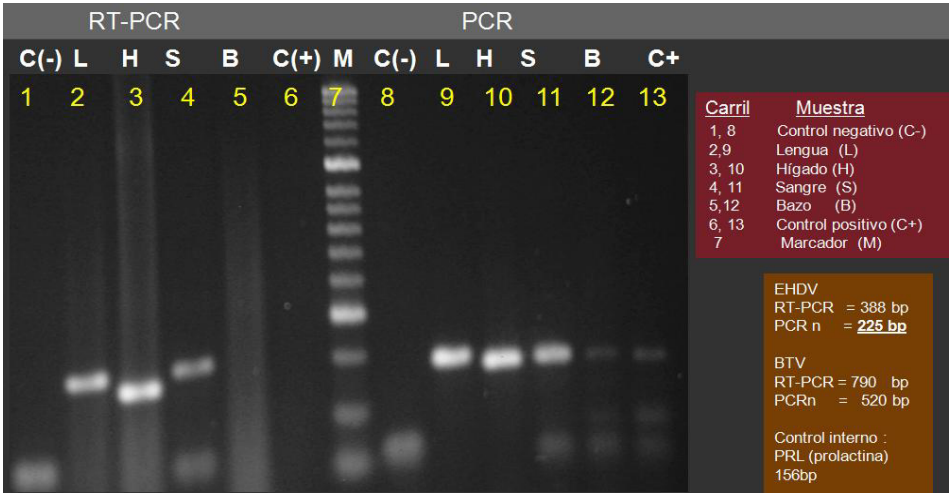
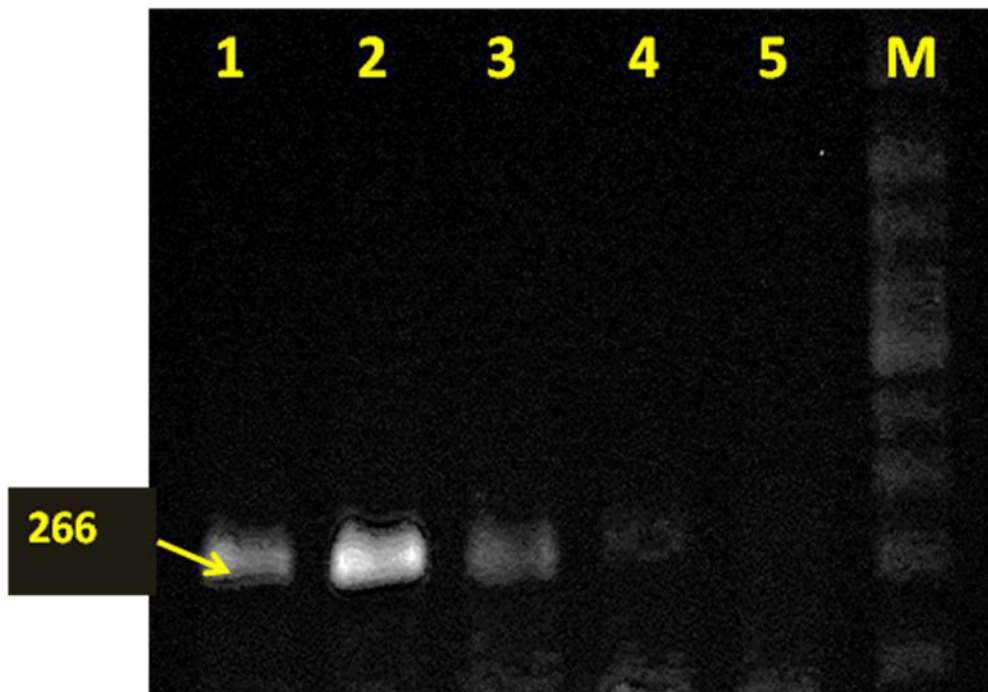


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del 266 pb de un fragmento del gen NS3/NS3A del BTV en lotes de *Culicoides*. 1. Control positivo (vacuna comercial). 2 – 4 muestras representativas de los sitios General Bravo (2), Villaldama (3) y Linares (4), 5. Control negativo (agua destilada). M: Marcador de Peso Molecular.



8.DISCUSIÓN

En zonas endémicas ambos virus pueden potencialmente transmitirse por el mismo vector (Mellor, 2000), (Cetre-Sossah, 2014). Con excepción del sitio localizado en el municipio de Zaragoza, N.L., en el cual sólo se capturó un ejemplar, en todas las microrregiones analizadas fue posible capturar al vector *Culicoides*. La cantidad de mosquitos capturados fue dependiente de la microrregión ó sitio, la época del año, temperatura promedio y altura sobre el nivel del mar ($p < 0.01$) (Tabla 5). La identificación fenotípica básica de los especímenes capturados permitió conocer que todos los ejemplares correspondieron al complejo de especies *Culicoides variipennis* (Wirth, 1957, Borrer, 1989), (Rawlings, 1996). Aparentemente este complejo de especies está ampliamente disperso en Estados Unidos de América (Mullens, 1992, Holbrook, 2000) y en México (Wirth, 1957). La circulación de miembros de este complejo de especies de *Culicoides variipennis* se ha reportado en México desde el año 1948 (Macfie, 1948). El complejo de especies de *Culicoides variipennis* son competentes para transmitir virus del género Orbivirus (Familia Reoviridae) incluidos BTV y EHDV (Ruder, 2012), (Tabachnick, 1996) y otros agentes infecciosos (Drolet, 2005).

Hasta la fecha no se ha reportado la detección de secuencias genéticas a partir de mosquitos *Culicoides* que circulan en el Noreste de México. La detección y el monitoreo de estos insectos es importante para el control de los patógenos que potencialmente pueden transmitir (Maclachlan, 2013). En la región noreste de México se ha reportado actividad serológica en rumiantes silvestres y domésticos contra el BTV y el EEHV (Ávalos-Ramirez, 2003), (Suzan, 1983), (Teclaw, 1985), (Martinez, 1999). BTV ha sido aislado de bovinos y ovejas de esta y otras regiones de México (Stott, 1989). En este trabajo las secuencias genéticas de ambos virus fueron detectadas solo en lotes de *Culicoides* obtenidos en primavera y verano de ciertos sitios (**Figura 1**) (**Tabla 5**). La secuencia genómica del BTV fue encontrada en proporciones relativamente altas en todos los sitios de captura (**Figura 5**) (**Tabla 5**). Las secuencia genómica del EEHV

(Figura 6) fue encontrada lotes de *Culicoides* capturados en solo dos de los cuatro sitios analizados (Figura 1) (Tabla 5).

Los datos del presente estudio sugieren fuertemente que el complejo de especies de *Culicoides variipennis* circula con secuencias genéticas de los virus de la Lengua Azul y el de la Enfermedad Epizootica Hemorrágica en el noreste de México. La circulación del potencial vector es variable y dependen de la estación del año y de las condiciones de la microrregión bajo estudio. Estas observaciones concuerdan con otros estudios realizados en otras partes del mundo (Kedmi, 2011). Observaciones similares han sido La detección de secuencias genéticas tanto BTV como EEHV implica que es muy probable que ambos virus estén circulando en esta zona de México. Estas observaciones sugieren que eventualmente las poblaciones de rumiantes domésticos y silvestres podrían verse afectados por mono o co-infecciones de ambos virus (Sailleau, 2012), (Toye, 2013). Bajo este contexto, alteraciones clínicas y patologías concernidas con la infección por *Orbivirus* pueden estar siendo no detectadas o mal diagnosticadas en las poblaciones de rumiantes silvestres y domésticos, lo que dificultaría su control (Maclachlan, 2013). La eventual presencia de ambos virus en las zonas y poblaciones estudiadas puede constituirse en brotes de enfermedad, lo cual compromete la salud, el manejo y la producción del sistema pecuario. Acorde a lo anterior, es necesario realizar estudios posteriores para determinar el eventual impacto de ambos virus en la salud de los animales susceptibles en la zona noreste de México.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron parámetros entomológicos, serológicos, moleculares y clínico-patológicos que permiten asociar la presencia de *Orbivirus* (VLA, EEHV, fam: REOVIRIDAE) tanto en el vector artrópodo (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) como en rumiantes silvestres y domésticos en el Noreste de México.

El vector *Culicoide* de los *Orbivirus*; BTV y EEHV se encuentra circulando en diversas microrregiones de Nuevo León (Zaragoza, Villaldama, Linares y Gral. Bravo). La dinámica poblacional del vector está asociada a la temperatura, humedad y época del año ($p < 0.05$). Existe fuerte evidencia serológica, clínica y patológica de la presencia de *Orbivirus* (VLA, EEHV) en rumiantes silvestres y domésticos de NL. Se detectaron secuencias genéticas de *Orbivirus* en los *Culicoides* capturados pero solo en ciertas épocas del año y en algunas regiones.

El *Culicoide variipennis* spp. que se encuentra en el estado de Nuevo León en cantidades variables según el área de estudio. Existe evidencia serológica y molecular del VLA en rumiantes silvestres y domésticos que está asociada a la especie animal. Encontrando una relación entre las estaciones del año (primavera, verano) y la presencia del vector. Con excepción del municipio de Zaragoza, N.L., en el cual sólo se capturó un ejemplar y detectamos actividad serológica, en todas las microrregiones analizadas fue posible capturar al vector *Culicoides* para VLA, viendo un incremento en la primavera en la incidencia del mismo y de igual manera se obtuvo evidencia molecular y serológica. Mientras que para el municipio de Linares N.L. no se detectó evidencia serológica. La cantidad de mosquitos capturados fue dependiente de la microrregión ó sitio, la época del año, temperatura promedio y altura sobre el nivel del mar.

10. RECOMENDACIONES

Conforme a lo encontrado en este estudio se considera deberá tener un mayor monitoreo, principalmente en las épocas críticas que serían primavera-verano y colección de datos determinados por serología y biología molecular de los microorganismos en los rumiantes silvestres y la frecuencia y/o incidencia de los vectores en las diferentes microrregiones de estudio.

11. LITERARUTA CITADA

Ávalos R R, Lozano R J, Marroquín C A, Ramírez R R, Riojas V V, González, S J, Salinas M J. 2003. Actividad serológica del Virus de la Lengua Azul (VLA) en rumiantes domésticos y silvestres de Nuevo León, XXVII Congreso Nacional de Buiatria, 1-5.

Aradaib IE, Smith WL, Osburn BI, Cullor JS. 2003. A multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of North American serotypes of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 26(2):77-87.

Balczun, C., Vorsprach, B., Meiser, Ch., Schaub, G. 2009. Changes of the abundance of *Culicoides obsoletus* s.s. and *Culicoides scoticus* in Southwest Germany identified by a PCR-based differentiation. *Parasitol Res*, 105:345–349.

Baylis, M., Connell, L., Mellor, P. 2008. Rates of bluetongue virus transmission between *Culicoides sonorensis* and sheep. *Medical and Veterinary Entomology*, 22, 228–237.

Boorman, J.. 1989. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna of Saudi Arabia*, 10, 160–224.

Boorman, J, Rowland, C. 1988. A key to the genera of British Ceratopogonidae (Diptera). *Entomology Gazzette*, 39, 65–73.

Calvete C, Miranda MA, Estrada R, Borrás D, Sarto i Monteys V, Collantes F, García-de-Francisco JM, Moreno N, Lucientes J. 2006. Spatial distribution of *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue virus, in Spain. *Vet Rec.* 158:130-1.

- Conte A, Goffredo M, Ippoliti M, Meiswinkel R. 2007. Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *Obsoletus* Complex in Italy. *Vet. Parasitol.*, 150 333–344.
- Davies F.G., Mungai J.N., Pini A. 1992. A new bluetongue virus serotype isolated in Kenya. *Vet. Microbiol.* **31**: 25-32.
- Du Toit, RM. 1944. The transmission of bluetongue and horse-sickness by *Culicoides*, Onderstepoort J. *Vet. Sci. Anim. Ind.* 19:7-16.
- Fulbright, T. E., J. A. Ortega-S. 2007. *Ecología y manejo de venado cola blanca*. Texas: Texas A y M University Press.
- Galindo-Leal, L., M. Weber. 1997. El venado de la Sierra Madre Occidental: ecología, manejo y conservación, México, Ediciones Culturales, 56-63.
- Gallina, S., S. Mandujano. 2009. Research on ecology, conservation and management of ungulates in Mexico. *Tropical conservation science* 2: 116-127.
- Gibbs E.P.J., Greiner E.C. 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 207-220.
- Gorman B.M. 1990. The bluetongue viruses. In: Roy, P., Gorman, B.M. (Eds). *Bluetongue Viruses*. Springer, Berlin. pp. 1-19.
- Gould A.R., Hyatt A.D. 1994. The Orbivirus genus: diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:163-188.
- López JW, Dubovi EJ, Cupp EW, Lein DH. 1992. An examination of the bluetongue virus status of New York State. See Ref. 200, pp. 140–46.
- Maan, S., Maa, N. S., Samuel, A.R., Rao, S., Attoui, H, Mertens, P. P. C. 2007. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *Journal of General Virology*, 88: 621–630.

Mandujano, S., A. González-Zamora. 2009. Evaluation of natural conservation areas and wildlife management units to support minimum viable populations of white-tailed deer in Mexico. *Tropical conservation science* 2: 237-250.

Mandujano, S., C. A. Delfin-Alfonso, S. Gallina. 2010. Comparison of geographic distribution models of white-tailed deer *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) subspecies in Mexico: biological and management implications. *Therya* 1: 41-68.

Mathieu, B., Perrin, A., Baldet, T., Del'ecolle, J.C., Albina, E., Cetre-Sossah, C. 2007. Molecular identification of Western European species of *Obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *Journal of Medical Entomology*, 44, 1019–1025.

Mecham, By J.O., Dean, V, C, and Jochim, M. 1986. Correlation of Serotype Specificity and Protein Structure of the Five U.S. Serotypes of Bluetongue Virus. *J. gen. Virol*, 67: 2617-2624.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S. et al.. 2007. First occurrence of *Culicoides* obsoletus-transmitted bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology Research*, 101, 219–228.

Meiswinkel, R., Gomulski, L.M., Del'ecolle, J.C., Goffredo, M., Gasperi, G. 2004. The taxonomy of *Culicoides* vectors complexes—unfinished business. *Veterinaria Italiana*, 40, 151–159.

Mellor, P.S., Pitzolis, G. 1979. Observation on breeding sites and light trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research*, 69, 229–234.

Mellor PS. 1990. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 162:143–61.

- Mellor, P.S., Wittmann, E.J. 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998–2001. *Veterinary Journal*, 164, 20–37.
- Mertens P.P., Brown F., Sanger D.V. 1984. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology* 135:207-217.
- Metcalf H.E., Lommel J., Beal V.C. Jr. 1980. Estimate of incidence and direct economic losses due to bluetongue in Mississippi cattle during 1979. *Proc. Annu. Meet. US anim. Health Assoc.* 84: 186-202.
- Mo CL, Thompson LH, Homan EJ, Oviedo MT, Greiner EC, Gonzalez J, et al. 1994. Bluetongue virus isolation from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. *Am. J. Vet. Res.* 55:211–15
- Monteys, V., Saiz-Ardanaz, M. 2003, *Culicoides midges* in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors, *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 288–293.
- Mullen GR, Anderson RR. 1998. Transmission of Orbiviruses by *Culicoides* Latreille species (Ceratopogonidae) among cattle and white-tailed deer in the southeastern United States. *Int. Congr. Dipterol.*, 4th, pp. 155–56. Oxford, UK.
- Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J. et al. 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology*, 124, 82–94.
- Pages, N., Sarto I Monteys, V. 2005. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Journal of Medical Entomology*, 42, 1026–1034.
- Rowlings, P. 1996. A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille—Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia*, 52, 57–71.

Sánchez Murillo, J.M., González López, M., Juez Yáñez, MJ., Lucientes Curdi, J., Estrada Peña, R., Talero Tornero, A., Del Solar Alarcón, A., Moreno Muñoz, J.C., Sanz Jiménez, C., Galán Caballero, L. 2007. Características del patrón alar de las principales especies del género *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) identificadas en Extremadura (España). *AVEDILA* 42:2-11.

Sarto I Monteys, V., Saiz-Ardanaz, M. 2003. *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue vectors. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 288–293.

Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F. et al. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Veterinary Record*, 157, 133–139.

Semarnat 1997. Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación productiva del Sector Rural: 1997-2000, México: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Steel, R.G.D., Dickey, D. A. 1997. Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach. 3ª.Ed. McGraw Hill: Boston, USA. 13-26.

Tabachnick WJ. 1992. Genetics, population genetics and evolution of *Culicoides variipennis*: implications for bluetongue virus transmission in the USA and its international impact. See Ref. 200, pp. 262–70

Tabachnick WJ, Holbrook FR. 1992. The *Culicoides variipennis* complex and the distribution of the bluetongue viruses in the United States. *Proc. US Anim. Health Assoc.* 96:207–12

Tabachnick WJ. 1996. *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. *Annu. Rev. Entomol.* 41:23–43

Venter, G.J., Mellor, P.S., Wright, I., Paweska, J.T. 2007. Replication of live attenuated vaccine strains of bluetongue virus in orally infected South African *Culicoides* species. *Medical and Veterinary Entomology*, 21: 239–247.

Weber, M., S. González (2003). Latin America deer diversity and conservation: A review of status and distribution. *Ecoscience* 10: 443-454.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Jorge Alejandro Lozano Rendón

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Manejo de Vida Silvestre y Desarrollo Sustentable

Tesis: IDENTIFICACIÓN E INCRIMINACIÓN DE POTENCIALES ESPECIES DE VECTORES (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) DEL VIRUS LENGUA AZUL (*ORBIVIRUS*) EN VENADO COLA BLANCA (*ODCOILEUS VIRGINIANUS*) Y ESPECIES DE GANADO EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Vida Silvestre.

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León el 13 de Enero de 1965, hijo de Federico Lozano Galván (+) y Genoveva Rendón Garza (+).

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en 1987.

Maestría en Ciencias Veterinarias Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido en 2004.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1989.

Artículo publicado

Molecular detection of bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in captured *Culicoides* spp. in the northeastern regions of Mexico

Lozano-Rendón, J. A.¹, Contreras-Balderas, A. J.², Fernández-Salas, I.², Zarate-Ramos, J. J.¹ and Avalos-Ramírez, R.^{1*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Av. Francisco Villalón s/n Col. Ex Hacienda el Canadá, Escobedo, N.L., 65050 México.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Apartado Postal 425, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455 México.

Received 6 July, 2015; Accepted 25 September, 2015

Full Length Research Paper

Molecular detection of bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in captured *Culicoides* spp. in the northeastern regions of Mexico

Lozano-Rendón, J. A.¹, Contreras-Balderas, A. J.², Fernández-Salas, I.², Zarate-Ramos, J. J.¹ and Avalos-Ramírez, R.^{1*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Av. Francisco Villa s/n Col. Ex Hacienda el Canadá, Escobedo, N.L., 65050 México.

² Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Apartado Postal 425, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66450 México.

Received 6 July, 2015; Accepted 25 September, 2015

Midges of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) captured in 2013 (February to November) in four micro-regions located in the northeast of Mexico were analyzed to determine the presence of genetic sequences of the viruses of Bluetongue (BT) and Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD) by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). In all the micro-regions sampled, it was possible to detect the presence of culicoides biting midges, along with other insects. The basic phenological identification of midges showed that all specimens corresponded to the *Culicoides variipennis* complex (Wirth & Jones). The amount of captured midges was associated with the annual mean temperature, altitude and time of year at the site of capture ($p < 0.01$). A total of 51 pools, each one of 3 to 15 female midges, were analyzed for genetic sequences for BTV (part of NS3 / NS3A gene segment 10) and EHDV (part of the NS1 gene segment 5) using oligonucleotides reported in previous studies. Except for the micro-region located in the municipality of Zaragoza, Nuevo Leon (23 ° 57'10.24"N, 99 ° 46'12.24"O; 1454 m), where it only was possible to capture one midge, midges groups captured at all other sites were RT-PCR positive for BTV and EHDV. The highest proportion of positive midges groups to RT-PCR was found in spring and summer. The presence of genetic sequences of BTV and EHDV in captured *Culicoides* spp. may eventually be associated with outbreaks of diseases caused by these viruses in wild and domestic ruminants in the northeastern part of Mexico. The information on the movement of midges carrying both viruses could be taken into account for the management of animal populations, and further studies are needed to confirm the presence of the mentioned viruses.

Key words: Bluetongue virus (BTV), Epizootic Hemorrhagic Disease virus (EHDV), *Culicoides*, RT-PCR, Ruminants, northeast Mexico.

INTRODUCTION

Bluetongue virus (BTV) and Epizootic Hemorrhagic Disease virus (EHDV) (Family Reoviridae, Genus

Orbivirus) are two highly related viruses which are considered emerging infectious agents globally

(MacLachlan and Guthrie, 2010; MacLachlan and Mayo, 2013). Both Orbivirus are able to affect a large variety of wild and domestic ruminants (Legisa et al., 2014; MacLachlan and Guthrie, 2010). Due of their negative effects on the economy of livestock systems, and the difficulties in their control and eradication, the appearance and movement of such Orbivirus in ruminants are a required declaration in the countries members of the World Organization for Animal Health (OIE) (Wittmann and Baylis, 2000), (OIE, 2015). Both viruses are transmitted, by primary form, between susceptible animals by the species of midges of the *Culicoides* genus (Diptera: Ceratopogonidae) (Searle et al., 2014), (Mellor et al., 2000). The *Culicoides* genus groups are the smallest and most abundant flying blood-sucking arthropods, and more than 1,400 species are reported worldwide (Mellor et al., 2000); of these, more than 39 species have been implicated as suspicious or confirmed as biological vectors of BTV and EHDV (Savini et al., 2011). The identification of different species of *Culicoides* can be accomplished by phenological and molecular methods (Meiswinkel et al., 2004), (Mathieu et al., 2007), (Werner and Kampen, 2007). The ability of these vectors to transmit BTV and EHDV lies in its ability to increase the viral load in the environment (Mellor, 2000), (Ruder et al., 2012). It implies the recognition of the virus receptors in the intestinal cells of midges, subsequent internalization and replication, as well as the spreading from this site to other tissues that allow the dispersion to salivary glands and ovaries of the insect (Mellor, 2000). The presence of these viruses in the tissues of their insect vectors is indicative of their movement in certain geographic region (Hoffmann et al., 2009); therefore, the distribution of arboviral diseases caused by these viruses depends on the presence and distribution in the environment of such insect vectors (Wittmann and Baylis, 2000). The epidemiology and outbreaks of infections caused by BTV and EHDV depend on the multiple interactions that exist between these viruses, their vectors, the environment and the susceptibility of ruminants (Mellor, 2000) (Savini et al., 2011) (Legisa et al., 2014). In Mexico, serologic and virologic evidence has been reported for BTV in domestic ruminants (Hernandez et al., 1994), (Stott et al., 1989) (Suzan et al., 1983), (Mooehead-Jackson, 1981), (Teclaw et al., 1985). Particularly, in the northeastern region of Mexico, high rates of seropositivity against BTV and EHDV in populations of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) has been reported (Martínez et al., 1999). According to these data, favorable environment conditions for the presence and movement of the *Culicoides* vector in this area of the country are apparently occurring. The present study was performed

to determine the presence of genetic sequences of the orbivirus BTV and EHDV in their potential arthropod vector (*Culicoides* midges), caught in selected regions in the northeast of Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Study area and sample collection

Capture sites for biting midges include four distinct micro-regions located in the state of Nuevo Leon, in the northeast of Mexico (Figure 1). The sites show differences in altitude above sea level, temperature, average annual precipitation and predominant vegetation. Each site was located near pens of ranches with domestic ruminants (cattle, goats, sheep), not more than 20 m away and with the concurrence of wild ruminants (white-tailed deer) within an area of 5 km. The capture of midges was carried out with Mosquito Magnet® traps (Liberty Plus, American Biophysics Co., USA). The traps were set at 1.5 m above ground and operated from 1 h before sunset until 1 h after sunrise. Captured midges were deposited in a plastic bag and transported under refrigeration to the laboratory for further analysis. The capture lasted from February to November 2013. The four capture sites were visited once in a month.

Identification of specimens

Previous separation of other captured insects, *Culicoides* (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) were identified with the aid of a binocular stereoscopic microscope (Carl Zeiss) according to the characteristics observed in the wings as reported by Rawlings (1996) and Borror et al. (1989). The identification is based on the characteristic pattern of dark and light areas of the wings, the dorsal side of the thorax, size and shape of the segment of the antennae, the relative position of the eyes, the shape of the spermatheca in females and the shape of the genitals in males (Meiswinkel et al., 2004; Werner and Kampen, 2007). The data of the specimens were recorded with the program of Microsoft Excel version 2007 and the samples of some specimens by a digital photography. After the identification, the specimens were separated according to sex and depending on the quantity, a sample 3 to 5 male and female midges were preserved in 70% ethanol while the remaining specimens were kept frozen at -80°C until use in RT-PCR.

Molecular detection of orbivirus (BTV and EHDV)

Pools of 7 to 15 female specimens were analyzed separately to determine the presence of genetic sequences of BTV and EHDV by RT-PCR. Total RNA from each batch was obtained using the commercial kit "FastRNA® Soil Pro - Direct Kit" and the Fast Prep-24 (www.mpbio.com), following the manufacturer's recommendations. RNA was recovered in 30 µl of DEPC-treated water and stored at -70°C until use. The quantity and quality of total RNA harvested was analyzed by spectrophotometry at 260 nm using the Epoch™ device and Gen5™ microplate data analysis software (www.biotek.com). For the RT-PCR analysis, total RNA concentration was adjusted to 1 µg/µl with DEPC-treated water. The RT-PCR reactions were performed with the help of the commercial kits "SuperScript III One Step RT-PCR System with

*Corresponding author. E-mail: ramiro.avalosrm@uanl.edu.mx. Tel: +52(81)83294000 ext. 3616.

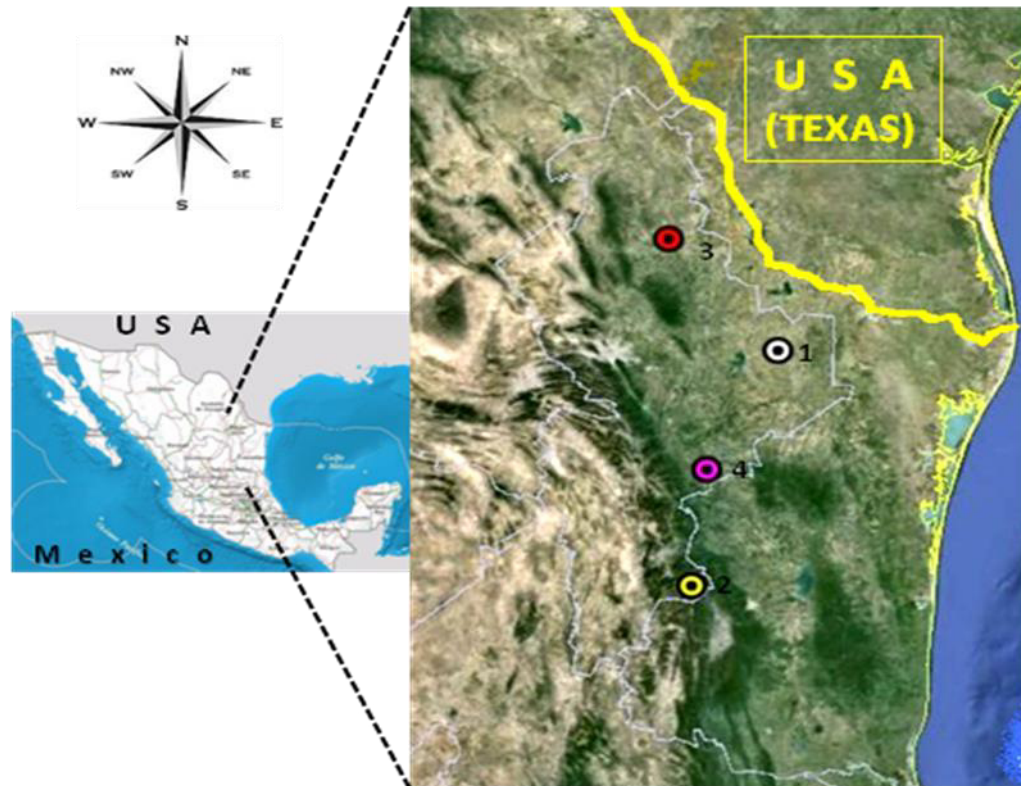


Figure 1. Relative position of the capture sites of the *Culicoides* spp in the regions at the Northeast of Mexico. 1, General Bravo; 2, Zaragoza; 3, Villaldama; 4, Linares.

Platinum® Taq High Fidelity" and "AccuPrimeTMSuperMix I" (www.invitrogen.com), following the manufacturer's recommendations. For the amplification of the gene segments from each virus, specific oligonucleotides were used as previously reported for BTV (Leblanc et al., 2010) and EHDV (Aradaib et al., 2003). In both cases, the oligonucleotides were designed based on highly conserved regions within the NS3 / NS3A of the segment 10 of BTV (BTV serotype 9) and of the NS1 gene segment 6 of the EHDV (EHDV serotype 1), respectively. The names and sequences of the oligonucleotides for the amplification of genomic fragment of BTV are: BTV-20F 5'-ATGCTATCCGGGCTGATYC-3', BTV-285R 5'-ACRTCATCACGAAACGCTTC-3'. Both oligonucleotides amplify a fragment of 266 bp (Leblanc et al., 2010). The genetic sequence of EHDV was amplified in two steps, first by RT-PCR with the following oligonucleotides: 5'-TCGAAGAGGTGATGAATCGC-3' and 5'-TCATCTACTGCATCTGGCTG-3' and subsequently with nested PCR with the following oligonucleotides: 5'-CATGCGGCATATAGATTGGC-3' and 5'-GTCATCTAGCAGATGCGTG-3'. These latter oligonucleotides amplify a specific fragment of EHDV of 225 bp (Aradaib et al., 2003). The amplification of gene segments from both viruses was performed in a first instance with gradient RT-PCR to determine the optimum bonding temperature of the primers. All the PCR reactions were performed in a thermocycler (Maxygen, Union City, Calif. USA) to a final volume of 50 µl per tube. The reaction of the RT-PCR step was one initial denaturation at 95°C for 1 min followed by 30 min at 48°C (cDNA synthesis) and 95°C for 1 min. The thermal cycles of PCR amplification were: 1 min at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 30 s (denaturation of DNA), 50°C for 30 s (oligonucleotide binding) and 72°C for 40 s (DNA extension) and a final incubation at 72°C for 10 min. 5 µl of the amplification product

were analyzed by electrophoresis in 2.5% agarose gels stained with commercial dye GelRed™ according to the standard protocol. The size of the amplified product was compared against a molecular weight marker of 1 Kb (Axygen™). The pools were considered positive if the band size for each respective genetic sequence of the virus was observed. The image obtained of the gel was documented electronically with the help of the equipment and the program of MultiDoc-It Imaging System (www.uvp.com). In each run, negative and positive controls of the reaction were included. The positive control reaction of RT-PCR for detection of BTV was the RNA obtained from a commercial vaccine against the virus containing serotype 10 (Colorado Serum Company, Denver, USA.); for EHDV it was not possible to include a positive control. Negative controls consisted of sterile double distilled water free of RNase and DNase, containing the reaction mix except nucleic acid.

Statistical analysis

The association between the presence of *Culicoides* spp. with the micro-region, altitude above the sea level and the monthly average of local temperature was analyzed by Chi-square using the WinEpi program, considering $p < 0.05$ as significant. The data were processed in the program Working in Epidemiology (Blas 2006, <http://www.winepi.net/>), with a confidence level of 95%.

RESULTS

The results of the study are shown in the Table 1,

Table 1. Relationship between the molecular detection of Bluetongue Virus (BTV) and Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV) in pools of *Culicoides* spp. and the capture site in northeastern regions of Mexico.

Town	Geographical Position ⁽¹⁾	Altitude ⁽²⁾	Season of the Year ³					
			Spring [272] ⁽⁴⁾		Summer [274]		Autumn [22]	
			BTV	EHDV	BTV	EHDV	BTV	EHDV
General Bravo[368] ⁽⁴⁾	25°49'2.24''N, 99°15'31.47''O.	137	5/11 ⁽⁵⁾	3/11	7/15	3/15	0/2	0/2
Linares[101]	24°51'13.69''N, 99°32'40.76''O.	345	2/8	0/8	1/3	0/3	0/2	0/2
Villaldama[94]	26°29'04.06''N, 100°26'10.32''O.	434	2/5	1/5	1/3	2/3	0/1	0/1
Zaragoza[1]	23°57'10.24''N, 99°46'12.24''O.	1454	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0	0/0
Total .			9/24	4/24	9/22	5/22	0/5	0/5

⁽¹⁾Capture site. ⁽²⁾Altitude above the sea level. ⁽³⁾Spring = March-May, Summer June-August, Autumn= September-November. ⁽⁴⁾[] Analyzed female midges captured by season or town. ⁽⁵⁾Lots + / N ° total of batch analyzed.

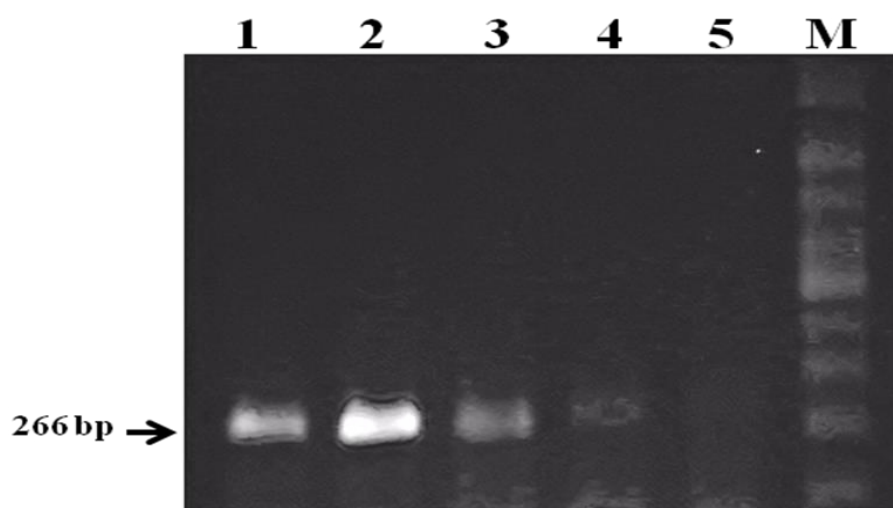


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the amplification product of 266 bp (arrow) fragment of the gene NS3/NS3A of BTV in *Culicoides* pools. Lanes: 1, Positive Control (commercial vaccine); 2-4, representative samples of the sites in General Bravo (2), Villaldama (3) and Linares (4); 5, negative control (distilled water); M, molecular weight marker.

according to the geographical position (town) and season of year. A total of 564 female midges distributed on 51 pools were analyzed by RT-PCR. From the total of pools, 18 and 9 were positive for BTV and EHDV, respectively. When the season is taken into account, spring and summer showed the highest occurrence of both Orbiviruses, with a frequency of 9/24 in spring and 9/22 in summer for BTV and 4/24 in spring and 5/22 in summer for EHDV. In the autumn months (September to November) it was not possible to detect positive pools. By geographical position (Figure 2) the town of Bravo showed the highest occurrence of positive pools with a frequency of 12/28 for BTV and 6/28 for EHDV. Through the study, the capture site located in the town of Zaragoza (Figure 1), with an altitude above sea level of 1454 m, is the only one place where practically no midges were captured. In this site it was possible to catch

a single specimen in summer. However, and taking into account this specimen, in virtually all analyzed micro-regions (Figure 1), at least one midge was captured. With these data, it appears that the amount of captured midges was dependent on the micro-region and season of year ($p < 0.1$) (Table 1). Though, in the study the quantity of harvested midges could have been influenced by the device type (Mosquito Magnet®) used to trap the *Culicoides* midges as well as by their monthly use at each site, the usage frequency (from sunset to sunrise, ~12 h) and local wind (climate) conditions at time of trapping. In our study, the primary objective was the detection of genetic sequences Orbiviruses BTV and EHDV in *Culicoides* circulating in northeastern Mexico. So biting midges trapped were identified only at basic phenotypic level to determine if they belong to the genus *Culicoides*. In addition, the basic phenotypic identification

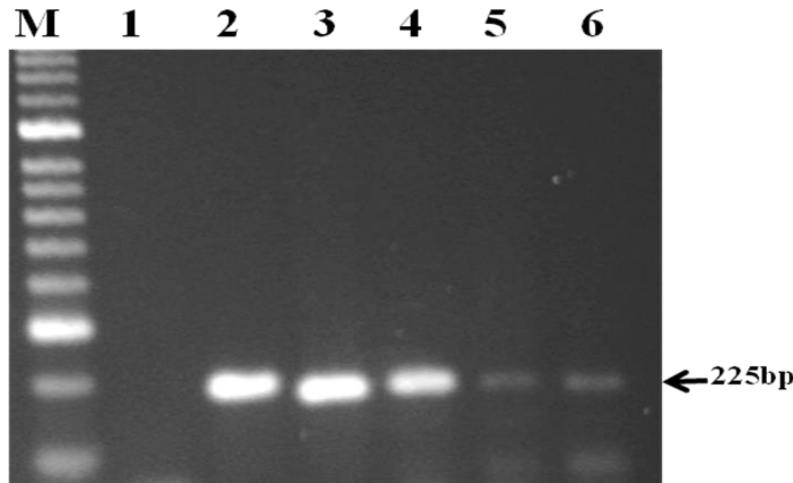


Figure 3. Agarose gel electrophoresis (stained with Gel RedTM) of RT-PCR and Nested PCR for the detection of EHDV, in which a specific PCR product of ~ 225 bp (arrow) of the NS1 gene segment 6 of the EHDV is shown. M, molecular weight marker; lanes: 1, negative control (double distilled water); 2-6, representative samples of pools of midges collected from different parts of the Northeastern regions of Mexico.

of all midges captured showed that all specimens corresponded to the *Culicoides variipennis* complex (Coquillett) (Wirth, 1957; Borror et al., 1989), (Rawlings, 1996). Midges of *C. variipennis* complex comprise the species *C. variipennis*, *C. sonorensis* and *C. occidentalis* (Schmidtman et al., 2011; Tabachnick, 1996). In the present study, no further analyses were performed in *Culicoides* midges to determine the species. For molecular detection of BTV on midges, preliminary gradient-PCR experiments were conducted using a BTV vaccine strain serotype 10 (data not shown). On the other hand, unfortunately we were unable to include a positive control in our experiments to detect EHDV, so the findings are based on the band size as previously described (Aradaib et al., 2003). Examples representing the PCR amplification products of 266 bp for BTV and 225 bp for EHDV from each studied region are shown in Figures 1 and 2, respectively. Amplicons were of the same molecular weights as those expected from amplification of BTV (LeBlanc et al., 2010) and EHDV (Aradaib et al., 2003) viral nucleic acids. PCR assays performed separately for both viruses in each of the 51 pools of *Culicoides* midges generally resulted in bands of the expected size of variable intensity (Figures 2 and 3).

DISCUSSION

The detection of the BTV and EHDV and its biological vector *Culicoides* spp. in certain areas of livestock production is important for the design of management programs and for the health of domestic and wild animals susceptible to these viruses (Hoffmann et al., 2009),

(Charron, et al., 2013), (Coetzee et al., 2012; Savini et al., 2011). In endemic areas both viruses can potentially be transmitted by the same vector (Mellor et al., 2000), (Cêtre-Sossah et al., 2014). The presence of *Culicoides* midges has been reported in Mexico since 1948 (Macfie, 1948). Apparently, these types of biting midges are widely dispersed in USA and Latin America (Mullens and Dada, 1992), (Holbrook et al., 2000), (Lager, 2004). It has been reported that *C. variipennis* var. *sonorensis* midges are competent to transmit the virus of the Orbivirus genus (Family Reoviridae), including BTV and EHDV (Ruder et al., 2012), (Tabachnick, 1996), as well as and other infectious agents (Drolet et al., 2005). In the US, *C. variipennis* var. *sonorensis* midges have been reported as the primary vector of EHDV and BTV (Foster et al., 1977; Tabachnick, 1996; Tabachnick, 2004). Apparently, very little information is available about the main vector (s) involved in the transmission of BTV and EHDV outside US in the American continent (Lager, 2004). Although several studies have implicated *Culicoides variipennis* var. *insignis* as the predominant vector in South America, and it has been captured in Central America and the Caribbean (Lager, 2004), (Mo et al., 1994), (Ronderos et al., 2003), there are no recently reports of its presence in Mexico. The detection and monitoring of these midges are important for the control of the pathogens that they can potentially transmit (MacLachlan and Mayo, 2013). In the northeastern region of Mexico, serological evidence has been reported in wild and domestic ruminants for both BTV and EHDV (Suzan et al., 1983), (Teclaw et al., 1985), (Martinez et al., 1999). On the other side, BTV has been isolated from cattle and sheep in this and other regions of Mexico (Stott et al.,

1989). However, to date the detection of genetic sequences of BTV and or EHDV from *Culicoides* biting midges circulating in the northeastern of Mexico has not been reported. In this work, genetic sequences of both viruses were detected in pools containing only *Culicoides*, obtained in spring and summer of certain sites (Figure 1) (Table 1). The BTV genomic sequence was found in relatively high proportions in all sites of capture (Figure 2) (Table 1). The putative genomic sequence of EHDV (Figure 3) was found in pools of *Culicoides* captured in only two of the four sites analyzed (Figure 1) (Table 1). These observations are consistent with the high seropositivity against both viruses, recorded in ruminants from this geographical area of Mexico. Taking together, the data presented in this study strongly suggests that *Culicoides spp* do contain genetic sequences of the Bluetongue virus and the Epizootic Hemorrhagic Disease Virus in the northeastern regions of Mexico. The circulation of this potential vector is variable and depends on the season of the year and the conditions of the micro-regions under study. These observations are consistent with other studies in other parts of the world (Kedmi et al., 2011). The detection of genetic sequences of BTV and EHDV implies that it is very likely that both viruses are circulating in this area of Mexico. This result is in accordance with the high seropositivity recorded in previous serological studies in this region (Suzan et al., 1983; Teclaw et al., 1985; Martinez et al., 1999). These observations suggest that eventually the population of domestic and wild ruminants could be affected with the infection of one or both viruses (Sailleau et al., 2012; Toye et al., 2013). Under this context, clinical alterations and the concerned pathologies caused by the infection of these Orbivirus may be going undetected or misdiagnosed in populations of wild and domestic ruminants, which make it difficult to control (MacLachlan and Mayo, 2013). The possible presence of both viruses in the areas and populations studied may result in disease outbreaks, which could compromise the health and management of the livestock in the production system. According to the above mentioned, further studies are needed to determine the potential impact of both viruses in the health of susceptible animals in the northeast of Mexico.

Conflict of interests

The author(s) did not declare any conflict of interest.

REFERENCES

- Aradaib IE, Smith WL, Osburn BI, Cullor JS (2003). A multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of North American serotypes of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26(2): 77-87.
- Borror DJ, Triplehorn CA, Johnson NF (1989). An introduction to the study of insects. 6th edition, Philadelphia, Saunders College Publishing.
- Cêtre-Sossah C, Roger M, Sailleau C, Rieau L, Zientara S, Bréard E, Viarouge C, Beral M, Esnault O, Cardinale E (2014). Epizootic haemorrhagic disease virus in Reunion Island: evidence for the circulation of a new serotype and associated risk factors. *Vet. Microbiol.* 170(3-4): 383-390.
- Charron MVP, Kluiters G, Langlais M, Seegers H, Baylis M, Ezanno P (2013). Seasonal and spatial heterogeneities in host and vector abundances impact the spatiotemporal spread of bluetongue. *Vet. Res.* 44: 44.
- Coetzee P, Stokstad M, Venter EH, Myrmel M, Vuuren MV (2012). Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *Virol. J.* 9: 198.
- Drolet BS, Campbell CL, Stuart MA, Wilson WC (2005). Vector competence of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) for vesicular stomatitis virus. *J. Med. Entomol.* 42(3): 409-418.
- Foster NM, Breckon RD, Luedke AJ, Jones RH (1977). Transmission of two strains of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus in deer by *Culicoides variipennis*. *J. Wildl. Dis.* 13:9-16.
- Hernández DJ, Salman MO, Walton TE, Raich TJ, Pujol-Manriquez C, Mason J, Greiner EC (1994). Aspectos epidemiológicos y entomológicos de la enfermedad de la lengua azul en ganado bovino. *Vet. Mex.* 25(3): 227-230.
- Hoffmann B, Bauer B, Bauer C, Bätza H-J, Beer M, Clausen P-H, Geier M, Gethmann JM, Kiel E, Liebisch G, Liebisch A, Mehlhorn H, Schaub GA, Werner D, Conraths FJ (2009). Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 15(9): 1481-1484.
- Holbrook FR, Tabachnick WJ, Schmidtman ET, McKinnon CN, Bobian RJ, Grogan WL (2000). Sympatry in the *Culicoides variipennis* complex (Diptera: Ceratopogonidae): a taxonomic reassessment. *J. Med. Entomol.* 37(1): 65-76.
- Kedmi M, Galon N, Herzinger Y, Yadin H, Bombarov V, Batten C, Shpigel NY, Klement E (2011). Comparison of the epidemiology of epizootic haemorrhagic disease and bluetongue viruses in dairy cattle in Israel. *Vet. J.* 190(1): 77-83.
- Lager IA (2004). Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet. Ital.* 40(3):89-93.
- Leblanc N, Rasmussen TB, Fernández J, Sailleau C, Rasmussen LD, Uttenthal A, Zientara S, Belák S, Hakhverdyan M (2010). Development of a real-time RT-PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of all serotypes of bluetongue virus. *J. Virol. Methods* 167(2): 165-171.
- Legisa DM, Gonzalez FN, Dus Santos MJ, (2014). Bluetongue virus in South America, Central America and the Caribbean. *Virus Res.* 182: 87-94.
- Macfie JW (1948). Some species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from the state of Chiapas, Mexico. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 42(1): 67-87.
- MacLachlan NJ, Guthrie AJ (2010). Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet. Res.* 41(6): 35.
- MacLachlan NJ, Mayo CE (2013). Potential strategies for control of bluetongue, a globally emerging, *Culicoides*-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. *Antiviral Res.* 99(2): 79-90.
- Martinez A, Salinas A, Martínez F, Cantú A, Miller D K (1999). Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. *J. Wildl. Dis.* 35(4): 799-803.
- Mathieu B, Perrin A, Baldet T, Delécolle JC, Albina E, Cêtre-Sossah C (2007). Molecular identification of Western European species of obsolete complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J. Med. Entomol.* 44(6):1019-1025.
- Meiswinkel R, Gomulski LM, Delécolle JC, Goffredo M, Gasperi G (2004). The taxonomy of *Culicoides* vector complexes unfinished business. *Vet. Ital.* 40(3): 151-159.
- Mellor PS (2000). Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *J. Comp. Pathol.* 123(4): 231-247.
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000). *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 307-340.
- Mo CL, Thompson LH, Homan EJ, Oviedo MT, Greiner EC, Gonzalez J, Saenz M, Interamerican Bluetongue Team (1994). Bluetongue virus

- isolation from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. *Am. J. Vet. Res.* 55(2):211-215.
- Moorehead-Jackson RC (1981). Estudio de la presencia de anticuerpos precipitantes contra el virus de la lengua azul en ovinos y bovinos sacrificados en el rastro de ferrería de la ciudad de México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Distrito Federal, Universidad Nacional Autónoma de México. Licenciatura.
- Mullens BA, Dada CE (1992). Spatial and seasonal distribution of potential vectors of hemorrhagic disease viruses to peninsular bighorn sheep in the Santa Rosa Mountains of southern California. *J. Wildl. Dis.* 28(2): 192-205.
- OIE (2015). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015, updated: 1st World Organization for Animal Health.
- Rawlings P (1996). A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille - Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia* 52:57-71.
- Ronderos M, Greco N, Spinelli G (2003). Diversity of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the area of the Yacyreta dam lake between Argentina and Paraguay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(1):19-24.
- Ruder MG, Howerth EW, Stallknecht DE, Allison AB, Carter DL, Drolet BS, Klement E, Mead DG (2012). Vector competence of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) to epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7. *Parasit. Vectors* 5: 236.
- Sailleau C, Zanella G, Breard E, Viarouge C, Desprat A, Vitour D, Adam M, Lasne L, Martrenchar A, Bakkali-Kassimi L, Costes L, Zientara S (2012). Co-circulation of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island. *Vet. Microbiol.* 155(2-4): 191-197.
- Savini G, Afonso A, Mellor P, Aradaib I, Yadin H, Sanaa M, Wilson W, Monaco F, Domingo M (2011). Epizootic hemorrhagic disease. *Res. Vet. Sci.* 91(1): 1-17.
- Schmidtman ET, Herrero MV, Green AL, Dargatz DA, Rodriguez JM, Walton TE (2011). Distribution of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Nebraska, South Dakota, and North Dakota: clarifying the epidemiology of bluetongue disease in the northern Great Plains region of the United States. *J. Med. Entomol.* 48(3):634-643.
- Searle KR, Barber J, Stubbins F, Labuschagne K, Carpenter S, Butler A, Denison E, Sanders C, Mellor PS, Wilson A, Nelson N, Gubbins S, Purse BV (2014). Environmental Drivers of *Culicoides* Phenology: How Important Is Species-Specific Variation When Determining Disease Policy? *PLoS ONE* 9(11): e111876.
- Stott JL, Blanchard-Channell M, Osburn BI, Riemann HP, Obeso RC (1989). Serologic and virologic evidence of bluetongue virus infection in cattle and sheep in Mexico. *Am. J. Vet. Res.* 50(3): 335-340.
- Suzan VM, Onuma M, Aguilar RE, Murakami Y (1983). Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn. J. Vet. Res.* 31(3-4): 125-132.
- Tabachnick WJ (1996). *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 23-43.
- Tabachnick WJ (2004). *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet. Ital.* 40(3):144-150.
- Teclaw RF, McConnell S, Wagner GG, Romo S, García Z (1985). Serologic study of the incidence and prevalence of bluetongue infections in cattle in the Mexican states of Nuevo Leon, Tamaulipas, Coahuila and San Luis Potosi. *Prev. Vet. Med.* 3(5): 437-443.
- Toye PG, Batten CA, Kiara H, Henstock MR, Edwards L, Thumbi S, Poole EJ, Handel IG, Bronsvoort BM, Hanotte O, Coetzer JA, Woolhouse ME, Oura CA (2013). Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease virus in local breeds of cattle in Kenya. *Res. Vet. Sci.* 94(3): 769-773.
- Werner D, Kampen H (2007). Gnizen (Diptera: Ceratopogonidae). An information pamphlet on the morphology, life history and distribution of biting midges together with data on the damage and epidemiology caused by bluetongue disease in Germany. *Stud. Dipterol.* 14(1):231-257.
- Wirth WW (1957). The North American subspecies of *Culicoides variipennis* (Diptera: Heleidae). U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. Washington D.C., United States Department of Agriculture. 1170: 1-35.
- Wittmann EJ, Baylis M (2000). Climate change: effects on *Culicoides*-transmitted viruses and implications for the UK. *Vet. J.* 160(2): 107-117.